



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**JUCIMARA FERREIRA FIGUEIREDO ALMEIDA**

**META-ANÁLISE E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO NA BUSCA DE  
BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO NOS GENES *CD2AP* E  
*MS4A4E* PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER**

VITÓRIA  
2018

**JUCIMARA FERREIRA FIGUEIREDO ALMEIDA**

**META-ANÁLISE E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO NA BUSCA DE  
BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO NOS GENES *CD2AP* E  
*MS4A4E* PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Flavia de Paula

VITÓRIA  
2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito  
Santo, ES, Brasil)  
Bibliotecário: Rafael Lima de Carvalho – CRB-6 MG-002926/O

---

A447m Almeida, Jucimara Ferreira Figueiredo, 1992 -  
Meta-Análise e Estudo de Associação na busca de biomarcadores de  
diagnóstico nos genes *CD2AP* e *MS4A4E* para a Doença de Alzheimer / Jucimara  
Ferreira Figueiredo Almeida – 2018.  
82 f. : il.

Orientador: Flavia de Paula.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito  
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Doença de Alzheimer. 2. Biomarcadores. 3. Metanálise. I. Paula, Flavia de. II.  
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

---

**“META-ANÁLISE E ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO NA BUSCA DE  
BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO NOS GENES CD2AP E MS4A4E  
PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER”**

Jucimara Ferreira Figueiredo Almeida

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção  
do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado por:

Profa. Dra. Flavia de Paula (UFES)  
Orientadora

Profa. Dra. Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler (UFES)  
Membro Interno

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba (UFJF)  
Membro Externo

Vitória-ES, 26 de fevereiro de 2018.

## **AGRADECIMENTOS**

À toda minha família por me apoiarem ao longo desta caminhada. Em especial ao Julio Cesar pela alegria diária.

À minha orientadora Dra. Flavia de Paula por ter acreditado em mim desde o início. Sou muito grata por ter me permitido realizar esta pesquisa. Agradeço muito pela paciência e disponibilidade que sempre teve comigo. Agradeço também por todos os ensinamentos. Agradeço pela pessoa linda que é.

As minhas amigas Lígia, Maira, Fernanda e Dalila, por serem sempre tão atenciosas comigo desde o início do mestrado e principalmente por todo o apoio que me deram nas práticas do laboratório. Agradeço pelo incentivo e carinho.

Agradeço especialmente a pesquisadora Lígia Ramos dos Santos por todos os ensinamentos, por toda ajuda e agradeço muito pela força que me deu em todo o projeto.

Aos companheiros do NGHM que me ajudaram e contribuíram para a realização desse estudo. Muito obrigada a todos!!!

Agradeço à Profa. Ma. Lúcia Helena Sagrillo Pimassoni por toda ajuda na análise estatística do trabalho. Agradeço muito pela paciência nos momentos complicados.

Nada seria possível sem o aprendizado que recebi de todos vocês!

Agradeço pelo apoio financeiro da FACITEC, MCTI/CNPQ/MEC/CAPES e CNPq/MS-Decit/SESA/FAPES para a realização desse trabalho.

*“É necessário cuidar da ética  
para não anestesiarmos a nossa consciência  
e começarmos a achar que tudo é normal.”*

*Mario Sergio Cortella*

## RESUMO

ALMEIDA, J.F.F. **Meta-Análise e Estudo de Associação na busca de biomarcadores de diagnóstico nos genes *CD2AP* e *MS4A4E* para a Doença de Alzheimer**. 2018. 82f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

A doença de Alzheimer (DA) é um dos tipos mais comuns de demência. Possui alterações patológicas como placas amilóides e emaranhados de neurofibrilas. A forma esporádica (DAE) representa 98% dos casos da doença de Alzheimer e apresenta etiologia multifatorial. A variante rs670139 do gene *MS4A4E* e rs9349407 do gene *CD2AP* foram consideradas, em estudos de *Genome wide association studies*, como associadas ao risco na DAE. O diagnóstico clínico da DA é difícil e apenas possível quando a doença já está em estágios avançados, sendo assim, estudos buscam encontrar biomarcadores para auxiliar no diagnóstico da doença em estágios precoces. Com isso, nos últimos anos, foram publicados vários estudos caso-controle investigando a associação de rs670139 do gene *MS4A4E* e rs9349407 do gene *CD2AP* com DAE em outras populações. Assim, este trabalho teve como objetivo investigar a associação entre o polimorfismo rs670139 *MS4A4E* e rs9349407 *CD2AP* com DAE em uma amostra de indivíduos da população da Grande Vitória, ES e realizar um estudo de meta-análise atualizado sobre a associação destas variantes com a doença. O estudo de associação foi realizado com uma amostra composta por 221 indivíduos não consanguíneos, sendo 139 indivíduos saudáveis e 82 pacientes com diagnóstico provável de DAE, pareados em relação à idade e gênero. As amostras foram genotipadas por *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado para cada grupo estudado. Os resultados de genotipagem foram validados por sequenciamento em 5% das amostras. Os dados foram analisados pelos testes estatísticos de Qui-quadrado, Odds ratio (Intervalo de confiança de 95%), Mann-Whitney e Regressão logística no programa SPSS (valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos). Na meta-análise a comparação alélica seguindo o modelo genético aditivo foi realizada pelo programa R. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o alelo A de rs670139

*MS4A4E* está associado ao risco na DAE. Este resultado apoia o papel de risco do rs670139, uma vez que, o polimorfismo, em estudos funcionais, foi correlacionado com o aumento das placas neuríticas. No entanto, não houve associação do polimorfismo rs670139 *MS4A4E* e rs9349407 *CD2AP* com DAE na população da Grande Vitória, ES e a meta-análise não encontrou associação para o rs9349407 *CD2AP*. Os resultados deste trabalho são importantes para ajudar a validar o papel das variantes genéticas sobre o risco de DAE.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer Esporádica, rs670139, rs9349407, Estudo de Associação.



## ABSTRACT

ALMEIDA, J.F.F. **Meta-Analysis and Association Study in the search for diagnostic biomarkers in *CD2AP* and *MS4A4E* genes for Alzheimer's Disease.** 2018. 82f. Dissertation – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Alzheimer's disease (AD) is one of the most common types of dementia. It has pathological changes, such as amyloid plaques and neurofibrillary tangles. In 98% of the cases, AD is sporadic or late-onset AD (LOAD) and presents a multifactorial characteristic. Variants rs670139 in *MS4A4E* gene and rs9349407 in *CD2AP* gene were considered associated with the risk in LOAD in studies with *Genome wide association studies*. The clinical diagnosis of AD is difficult and is only possible when the disease is already in advanced stages, so the studies are seeking to find biomarkers to help diagnose the disease in the early stages. Thus, in recent years, several case-control studies have been published investigating the association of rs670139 *MS4A4E* gene and rs9349407 *CD2AP* gene with LOAD in other populations. Thus, this study aimed to investigate the association between rs670139 *MS4A4E* and rs9349407 *CD2AP* with LOAD in a sample of individuals from Grande Vitória, ES and conduct an updated meta-analysis study on the association of these variants with the disease. The study performed was an association study with 221 individuals not consanguineous, including 139 individuals without Dementia matched by sex and age and 82 patients with diagnosis of probable LOAD. It was performed Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism for genotyping. As statistical analysis, it was performed Chi-square test, Odds ratio (Confidential interval of 95%), Mann-Whitney and Logistic regression at SPSS software. It was considered p significance with value  $< 0.05$ . It was also calculated the Hardy-Weinberg Equilibrium for each group. The genotype results were validated by sequencing in 5% of the samples. In the meta-analysis, the allelic comparison by additive genetic model was performed by R Program. The results obtained in this study suggest that the A allele of rs670139 *MS4A4E* is associated with risk in LOAD in meta-analysis. This result

supports a role of risk of rs670139, since this SNP in functional studies has been correlated with increased amyloid plaques. However, there is no association of rs670139 *MS4A4E* and rs9349407 *CD2AP* polymorphisms with LOAD in the population of Grande Vitória, ES and the meta-analysis there is no association of rs9349407 *CD2AP* polymorphisms with LOAD. The results of this work are important to help validate the role of genetic variants on the risk for LOAD.

Keywords: Sporadic Alzheimer's Disease, rs670139, rs9349407, Association Study.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Emaranhados neurofibrilares e Placa neurítica .....	19
Figura 2: Via amiloidogênica .....	22
Figura 3: Via não amiloidogênica e Via amiloidogênica.....	22
Figura 4: Emaranhados de neurofibrilas.. .....	24
Figura 5: Imagem dos emaranhados de neurofibrilas.....	24
Figura 6: Localização dos genes <i>APP</i> , <i>PSEN1</i> e <i>PSEN2</i> .....	25
Figura 7: Imagem do cérebro .....	32
Figura 8: Comprovante de submissão do manuscrito .....	46

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Sequência e referência dos <i>primers</i> . .....	40
Quadro 2: Padronização da reação de PCR. ....	40
Quadro 3: Padronização dos reagentes da PCR. ....	41
Quadro 4: Condições da digestão. ....	41

## LISTA DE SIGLAS

A $\beta$ 42	Peptídeo $\beta$ amilóide de aminoácido 42
A $\beta$ 40	Peptídeo $\beta$ amilóide de 40 aminoácidos
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADRDA	<i>Alzheimer's Disease and Related Disorders Association</i>
APOE	<i>Apolipoproteína E</i>
APP	Proteína Precursora Amilóide
BACE1	<i><math>\beta</math> site APP cleaving enzyme 1</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CD2AP	<i>CD2-associated protein</i>
CRAI	Centro de Referência de Atendimento ao Idoso
CT <sub>83</sub>	Fragmento residual C-terminal de 83 aminoácidos
CT <sub>99</sub>	Fragmento residual C-terminal de 99 aminoácidos
CT <sub>57-59</sub>	Fragmento C-terminal de 57 à 59
DA	Doença de Alzheimer
DAE	Doença de Alzheimer Esporádica
DAF	Doença de Alzheimer Familiar
DSM	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
DSM-IV	<i>Fourth Edition of Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
EH-W	<i>Equilíbrio de Hardy-Weinberg</i>
GWAS	<i>Genome-wide association study</i>
HSCMV	Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória
IC	<i>Intervalo de confiança</i>
IRM	Imagem por Ressonância Magnética
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MAPT	Microtubule-associated protein tau
MS4A4E	<i>Membrane-spanning 4-domains subfamily A4E</i>
MMSE	<i>Mini-Mental State Examination</i>
MS4A	<i>Membrane-spanning 4-domains subfamily A</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGHM	Núcleo de Genética Humana e Molecular

NINCDS	<i>National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke</i>
NMDA	Recetor N-metil-D-aspartato
OR	<i>Odds ratio</i>
OEGE	<i>Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies</i>
PSNE1	<i>Presenilina 1</i>
PSEN2	<i>Presenilina 2</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
PIB-PET	<i>Pittsburgh coumpond B- PET</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
sAPP $\alpha$	Peptídio solúvel APP $\alpha$
sAPP $\beta$	Peptídio solúvel APP $\beta$ aminoácidos
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
2.1. Histórico .....	19
2.2. Placas amilóides .....	20
2.3. Proteína TAU .....	23
2.4. A genética da Doença de Alzheimer .....	25
2.5. Biomarcadores .....	27
2.6. Novos genes candidatos a DAE .....	29
2.6.1 Gene <i>MS4A4E</i> .....	29
2.6.2 Gene <i>CD2AP</i> .....	30
2.7. Fatores de risco ambientais .....	30
2.8. Diagnóstico .....	31
2.9. Tratamento .....	33
2.9.1. Perspectivas futuras .....	34
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
3.1. Objetivo geral .....	37
3.2. Objetivos específicos .....	37
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>38</b>
4.1. Estudo de Associação .....	38
4.1.1. Análise genotípica .....	39
4.1.2. Análise estatística .....	42
4.2. Meta-análise .....	42
4.2.1. Revisão Sistemática .....	42
4.2.2. Critérios de inclusão e exclusão .....	43
4.2.3. Extração de dados .....	43
4.2.4. Análise estatística .....	44
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>72</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A expectativa de vida cresceu consideravelmente nas últimas décadas. Atualmente 12% da população mundial tem mais de 60 anos de idade, e estima-se que em 2050 será 22% da população (CUSTODIO et al., 2017). Este aumento da expectativa de vida da população levou a uma maior ocorrência de doenças relacionadas com a idade, especialmente as demências (CUSTODIO et al., 2017). A demência é a terceira causa de morte mais frequente em idosos (JELLINGER, 2008). A doença de Alzheimer (DA) é uma das formas mais comuns de demência na população idosa (KADMIRI et al., 2017). Hoje são mais de 46 milhões de pessoas com DA no mundo (CONDELLO; STOHR, 2016).

Um estudo realizado no Brasil mostrou que da população acima de 60 anos, 7,1% era acometida por algum tipo de demência, e que desses, 55,1% dos pacientes apresentavam DA (HERRERA et al., 2002). Estima-se que o Brasil possua 1,2 milhões de indivíduos com DA e que a incidência seja de 100 mil novos casos por ano (MENDES, 2008).

Frequentemente, o primeiro sintoma de DA é a perda de memória e com o desenvolvimento gradual da doença o paciente tem um declínio nas habilidades cognitivas, perda da autonomia e mudanças de personalidade (JIAO et al., 2015). Em exames de imagem e análises microscópicas observa-se morte neuronal e perda das sinapses, disfunção neurovascular, processos inflamatórios e atrofia cerebral causada pela formação de placas amilóides e emaranhados de neurofibrilas (HEINONEN et al., 1995; KANG; LEE; LEE, 2017; SCHEFF; SPARKS; PRICE, 1993).

A DA pode ser classificada como familiar (DAF) e esporádica (DAE). A DAF tem início precoce, antes dos 65 anos de idade e corresponde a menos de 2% dos casos de DA. Esta forma da doença tem herança autossômica dominante, com mutações nos genes que codificam a proteína precursora amiloide (APP), a pré-senilina 1 (PS1) ou a pré-senilina 2 (PS2) (LAMBERT et al., 2009).



A maior parcela de afetados pela doença possuem DAE (98%) e apresentam idade de início dos sintomas, em geral, a partir dos 65 anos. Nestes casos, a doença possui herança multifatorial, com fatores ambientais e genéticos envolvidos na sua etiologia (YU; TAN; HARDY, 2014). Entre as variantes genéticas associadas com a DAE descritas até o momento, destaca-se o alelo  $\epsilon 4$  do gene *Apolipoproteína E (APOE)* como o maior fator de risco genético para DAE em diferentes populações (LAMBERT; AMOUYEL, 2011).

Clinicamente, o diagnóstico da DA é difícil e apenas possível quando a doença já está em estágios avançados (JELLINGER et al., 2008). Para auxiliar o diagnóstico da doença, estudos buscam encontrar biomarcadores que permitam aprimorar o diagnóstico em estágios precoces da doença. Neste sentido, a identificação de biomarcadores genéticos permitiria um diagnóstico menos invasivo, mais preciso e com um valor mais acessível, como também poderia servir como marcador de progressão e resposta ao tratamento (LISTA et al., 2015).

Os estudos de associação amplo do genoma ou *Genome wide association studies* (GWAS) têm como objetivo detectar variações no genoma que estão associadas com características de interesse ou doenças. Este método busca identificar os genes que podem contribuir para o risco aumentado de desenvolver uma determinada doença complexa. Em 2011, estudos GWAS reportaram polimorfismos associados ao risco na DAE em populações caucasianas, como por exemplo, o rs670139 do gene *Membrane-spanning 4-domain subfamily A4E (MS4A4E)* e o rs9349407 do gene *CD2-associated protein (CD2AP)* (HOLLINGWORTH et al., 2011; NAJ et al., 2011a). Uma vez que a DAE é uma doença multifatorial, as variantes gênicas podem ter associações diferentes nas diferentes populações (OLIVEIRA et al., 2009). Portanto, estes polimorfismos são referência de variantes à serem validadas em populações específicas (ALLEN et al., 2012; TAN; YU; TAN, 2013).

Neste aspecto, tem ganhado destaque, a busca de variantes genéticas que possam ser usadas como biomarcadores para auxiliar no diagnóstico complementar da DA (FRIDMAN et al., 2004; KWOK; GU, 1999). Além disso, para melhorar a compreensão sobre os mecanismos genéticos na DA, numa população geral e em diferentes grupos étnicos é necessária uma atualização das informações através de um estudo de meta-

análise. Os estudos de meta-análise são importantes, pois integram os resultados encontrados nos estudos de casos-controles e atualizam a compreensão geral das variantes relacionados a DA.

O presente trabalho estudou os polimorfismos rs670139 *MS4A4E* e o rs9349407 *CD2AP* em um estudo de associação na população da Grande Vitória-ES e realizou uma meta-análise destas variantes.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Histórico

A Doença de Alzheimer foi inicialmente descrita pelo médico Aloysius Alzheimer que nasceu em 14 de junho de 1864 na Alemanha e morreu em 19 de dezembro de 1915 na Polônia (MAURER; VOLK; GERBALDO, 1997).

Aloysius Alzheimer estudou medicina na Universidade de Berlin, se tornou médico psiquiatra e no ano de 1888 apresentou a Tese de doutorado em Würzburg, Alemanha (MAURER; VOLK; GERBALDO, 1997). Em sua carreira, Aloysius investigava as doenças mentais. Aos 24 anos, Aloysius Alzheimer, foi trabalhar no Hospital Psiquiátrico de Frankfurt na Alemanha (MAURER; VOLK; GERBALDO, 1997). No ano de 1901, tratou uma paciente que foi diagnosticada com demência por exibir perda das faculdades mentais (MAURER; VOLK; GERBALDO, 1997). A paciente, Auguste D., tinha 51 anos de idade e apresentava mudanças no comportamento, delírios, agressividade e declínio das funções cognitivas (HIPPIUS; NEUNDÖRFER, 2003; THOMAS; FENECH, 2007). Em 1906, Auguste faleceu e Aloysius Alzheimer, após analisar o cérebro da paciente, verificou alterações histopatológicas que ainda não tinham sido descritas na literatura, como placas esféricas em todo o cérebro (Figura 1) (THOMAS; FENECH, 2007).

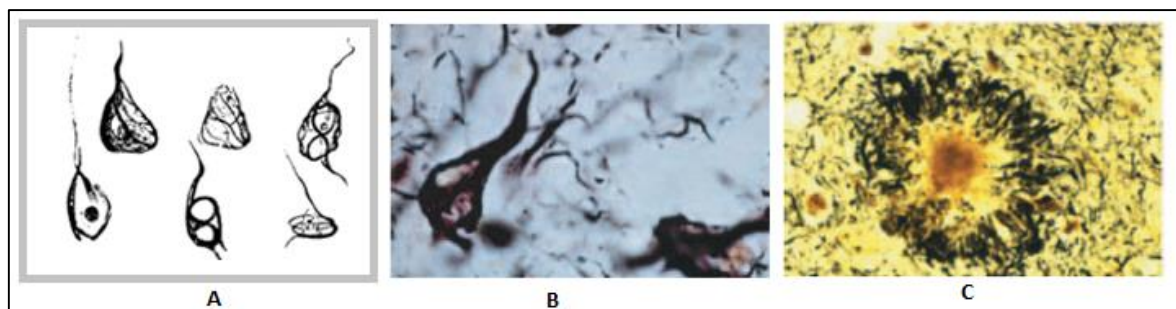


Figura 1: A: Desenho de Aloysius Alzheimer dos emaranhados neurofibrilares observados no cérebro da paciente Auguste; B: Emaranhados neurofibrilares; C: Placa neurítica (Modificado de ALZHEIMER, 1991; THOMAS; FENECH, 2007).

Neste mesmo ano, Aloysius, na 37ª Conferência de Psiquiatras da Alemanha, apresentou estas alterações cerebrais (figura 1) como sendo placas senis e emaranhados neurofibrilares (THOMAS; FENECH, 2007).

Um ano depois, Aloysius, publicou um artigo intitulado de “A characteristic serious disease of the cerebral cortex” no qual relata as alterações cerebrais da paciente diagnosticada com demência (MAURER; VOLK; GERBALDO, 1997).

A grande contribuição de Aloysius Alzheimer para a medicina foi a descrição desta doença, que no ano de 1910, Emil Kraepelin, mencionou pela primeira vez a doença como Doença de Alzheimer, em seu livro "The Handbook of Psychiatry", como uma homenagem à Aloysius Alzheimer (THOMAS; FENECH, 2007).

## 2.2. Placas amilóides

No diagnóstico de DA, a formação das placas amilóides extracelulares e os emaranhados neurofibrilares são as principais características histopatológicas cerebrais (THOMAS; FENECH, 2007).

As placas amilóides são formadas por agregados de peptídeos  $\beta$  amiloide de aminoácido 40 e 42 ( $A\beta_{40}$  e  $A\beta_{42}$ ) gerados pela processamento anormal do gene *Proteína Precursora Amiloide (APP)* (THOMAS; FENECH, 2007).

O gene *APP* codifica a proteína APP que tem papel em adesão celular, função sináptica e indução de apoptose (SUH; CHECLER, 2002). A proteína APP é abundante no sistema nervoso central e pertence a uma grande família de proteínas de membrana tipo I (NUSSBAUM; ELLIS, 2003). Esta proteína possui um longo domínio extracelular N-terminal e uma região citoplasmática C-terminal da qual origina-se por *splicing* de um mesmo transcrito de um único gene localizado no cromossomo 21q21 (NUSSBAUM; ELLIS, 2003). O processamento da APP depende de secretases distintas, e pode ocorrer pela via chamada de não-amiloidogênica e amiloidogênica (Figura 2).

A via normal, não-amiloidogênica, (Figura 3) é realizada por um complexo enzimático de  $\alpha$ -secretase e  $\gamma$ -secretase. A  $\alpha$ -secretase cliva a proteína APP e forma um fragmento solúvel APP $\alpha$  (sAPP $\alpha$ ) e um fragmento residual C-terminal de 83 aminoácidos (CT<sub>83</sub>) que fica ancorado na membrana celular (AVRAMOPOULOS, 2009; THOMAS; FENECH, 2007). O fragmento C-terminal ancorado à membrana sofre uma segunda clivagem pela enzima  $\gamma$ -secretase que cliva o CT<sub>83</sub>, e produz um peptídeo chamado de p3 e um fragmento C-terminal de 57 à 59 aminoácidos (CT<sub>57–59</sub>) (AVRAMOPOULOS, 2009; THOMAS; FENECH, 2007).

Alternativamente, pela via amiloidogênica, a APP pode ser clivada pela  $\gamma$ -secretase e  $\beta$ -secretase ou BACE-1 ( $\beta$  site APP cleaving enzyme). A enzima  $\beta$ -secretase cliva a APP formando um fragmento solúvel APP $\beta$  (sAPP $\beta$ ) e um fragmento residual C-terminal de 99 aminoácidos (CT<sub>99</sub>) (AVRAMOPOULOS, 2009; SUH; CHECLER, 2002; THOMAS; FENECH, 2007). Em seguida, a  $\gamma$ -secretase cliva o CT<sub>99</sub>, formando o fragmento de peptídeo A $\beta$  e um fragmento C-terminal de 57 – 59 aminoácidos (CT<sub>57–59</sub>) (AVRAMOPOULOS, 2009; SUH; CHECLER, 2002; THOMAS; FENECH, 2007). A  $\gamma$ -secretase forma dois tipos de peptídeo  $\beta$  amilóide: A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42 que estão presentes na placa A $\beta$  (JARRETT; BERGER; LANSBURY, 1993). O A $\beta$ 40 é a forma não tóxica do peptídeo  $\beta$  amilóide enquanto que o A $\beta$ 42 é a forma neurotóxica pois tem a capacidade de se agregar formando placas, induzindo estresse oxidativo o que pode levar a apoptose celular (JARRETT; BERGER; LANSBURY, 1993).

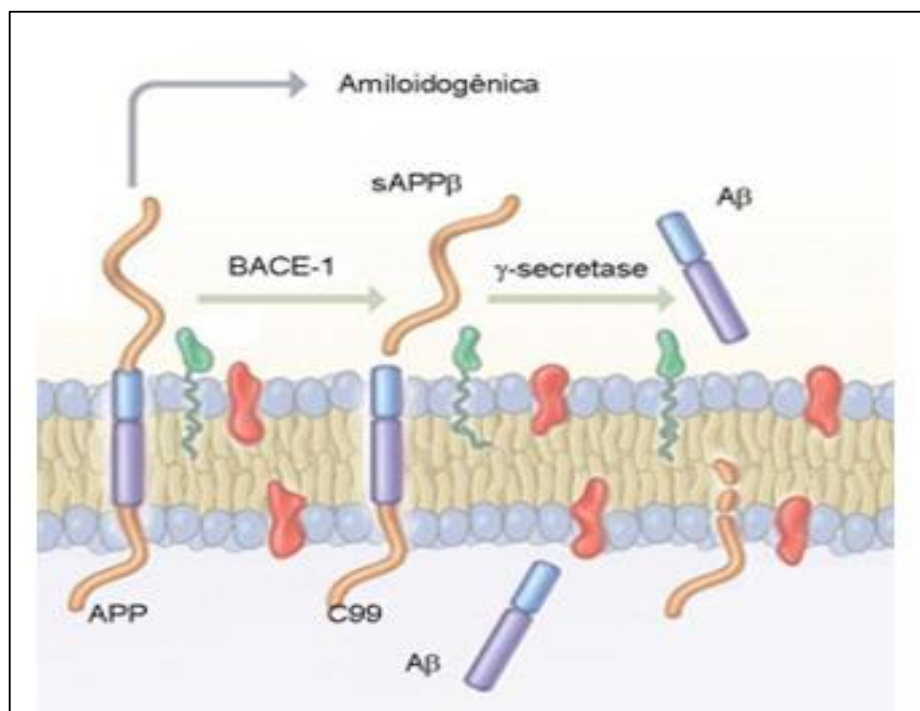


Figura 2: Imagem mostrando a Via amiloidogênica que pode levar a formação das placas amiloides (Modificado de QUERFURTH; LAFERLA, 2010).

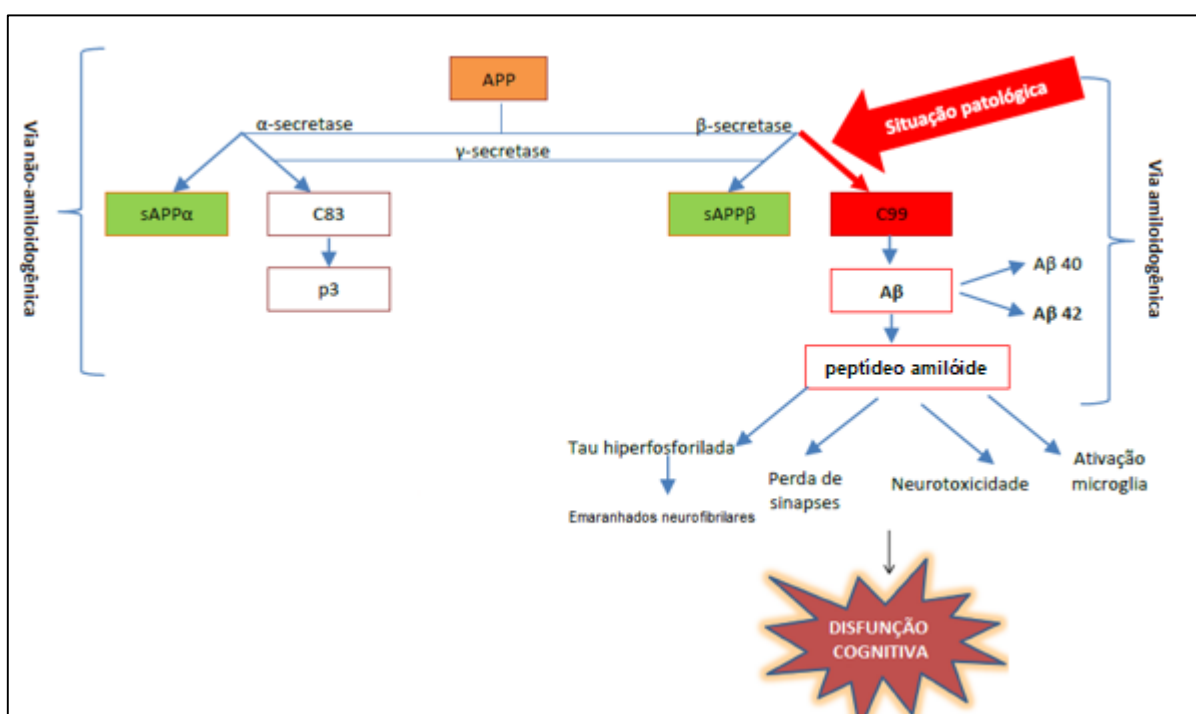


Figura 3: Esquema mostrando a Via não amiloidogênica e Via amiloidogênica (modificado de (KUMAR; SINGH; EKAVALI, 2015)

### 2.3. Proteína TAU

Na doença de Alzheimer, o acúmulo de emaranhados de neurofibrilas nos neurônios também podem ser responsáveis pelo processo de neurodegeneração (KOSIK; JOACHIM; SELKOE, 1986; WOOD et al., 1986).

Os emaranhados neofibrilares são formados pela hiperfosforilação da proteína Tau que é codificada pelo gene *Microtubule-associated protein tau* (*MAPT*) e estão presentes principalmente em neurônios piramidais no hipocampo e no neocórtex cerebral (QUERFURTH; LAFERLA, 2010). A proteína Tau interage com a proteína Tubulina formando os microtúbulos (Figura 4). Os microtúbulos fazem parte do citoesqueleto e auxiliam na estabilidade e funcionamento neuronal normais (BRION, 1998; THOMAS; FENECH, 2007). Esta interação da proteína Tau é regulada por enzimas, como a Glicogênio sintase cinase 3 (GSK3) e a Quinase Dependente de Ciclina 5 (CDK5) (IQBAL et al., 2005). Na doença de Alzheimer os filamentos de proteína Tau ficam hiperfosforilados (PASTERNAK, 2007). A fosforilação anormal da proteína Tau provoca uma desagregação entre Tau e a Tubulina, desestruturando os microtúbulos. Esses eventos formam os emaranhados de neurofibrilas (figura 5) que se depositam intracelularmente nos neurônios (CASTELLANI; ROLSTON; SMITH, 2011). Com isso, os neurônios sofrem comprometimento do transporte axonal, perda sináptica e por conseguinte, morte neuronal (BRION, 1998; CASTELLANI; ROLSTON; SMITH, 2011).

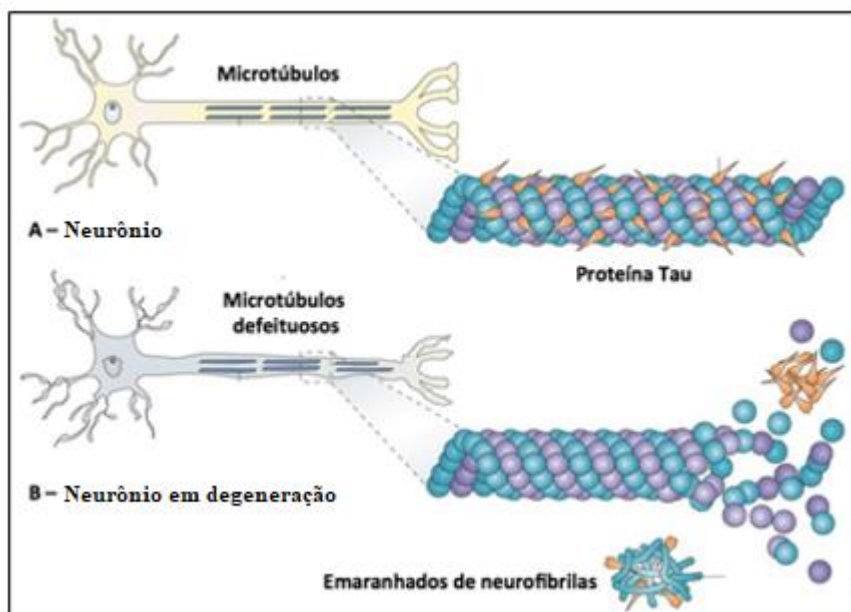


Figura 4: Imagem da formação de emaranhados de neurofibrilas. A) Imagem de um neurônio saudável mostrando os microtúbulos estáveis. B) Imagem de um neurônio não saudável que mostra a dissociação dos microtúbulos e a formação dos emaranhados de neurofibrilas (Modificado de BRUNDEN; TROJANOWSKI; LEE, 2009).

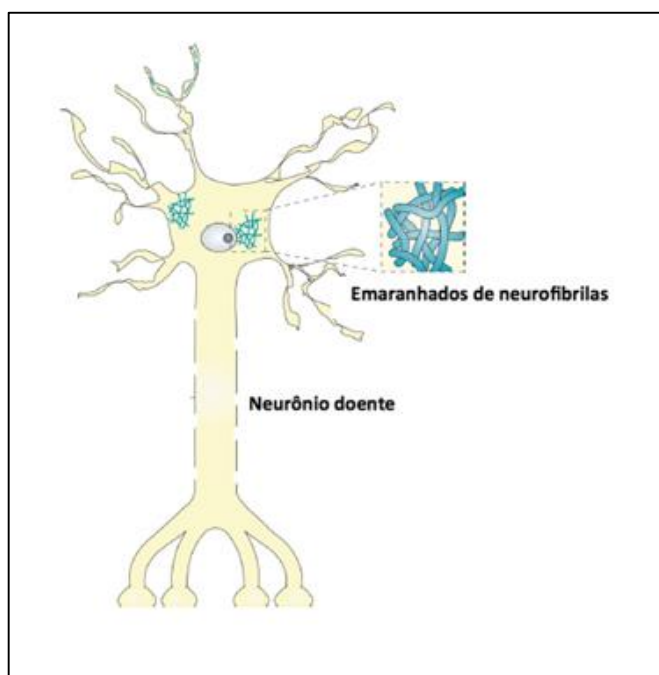


Figura 5: Imagem dos emaranhados de neurofibrilas dentro do neurônio doente (modificado de BRUNDEN; TROJANOWSKI; LEE, 2009).



## 2.4. A genética da Doença de Alzheimer

Há duas formas de herança da Doença de Alzheimer: a DAF (rara) e a DAE (mais frequente).

A Doença de Alzheimer familiar ou precoce ocorre, em geral, antes do 65 anos de idade e é uma desordem com padrão de herança autossômico dominante (BERTRAM; LILL; TANZI, 2010; HARPER, 1977; HOLTZMAN; MORRIS; GOATE, 2011). No início dos anos 1980, os pesquisadores que estudavam pacientes com síndrome de Down evidenciaram a associação entre a trissomia do 21 e DA (GOATE et al., 1991; KIDSON; CHEN, 1986). Entretanto, somente em 1991 a mutação no gene *APP* foi associada à doença de Alzheimer (GOATE et al., 1991). Além disso, mutações nos genes *Presenilina 1* (*PSEN1*) localizado no cromossomo 14q24.3 e *Presenilina 2* (*PSEN2*) no cromossomo 1q31-q42 (Figura 6), também estão associadas à doença de Alzheimer familiar (NUSSBAUM; ELLIS, 2003; SCHELLENBERG et al., 1992).

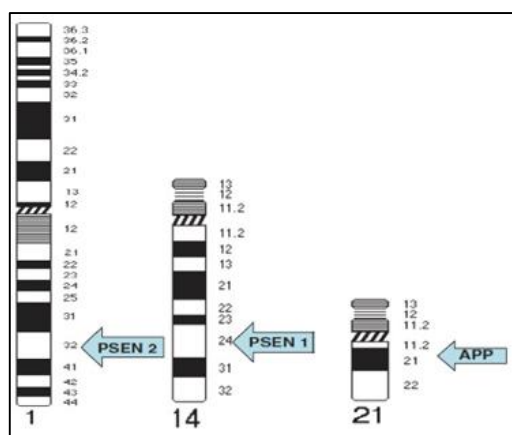


Figura 6: Localização dos genes *APP*, *PSEN1* e *PSEN2* nos cromossomos (Modificado de THOMAS; FENECH, 2007).

Os genes *PSEN1* e *PSEN2* codificam duas proteínas pré-senilinas 1 e 2, respectivamente, que são componentes do complexo  $\gamma$ -secretase e que participam no processamento da proteína APP (SUH; CHECLER, 2002). As mutações nos genes *APP*, *PSEN1* e *PSEN2* estão relacionadas ao aumento da formação de  $A\beta_{42}$  pois aumentam a atividade de proteólise de  $\gamma$ -secretase (CAI; GOLDE; YOUNKIN, 1993;

CITRON et al., 1992; SUZUKI et al., 1994). Apesar de ser uma desordem rara, cerca de 2% dos casos, a hipótese da cascata amilóide é a mais aceita e sugere que as mutações nos genes *APP*, *PSEN1* e *PSEN2* e a fosforilação anormal da proteína Tau ocasionem o processo neurodegenerativo da Doença de Alzheimer (HARDY; HIGGINS, 1992).

Já a Doença de Alzheimer esporádica ou tardia, ocorre, em geral, após os 65 anos de idade e é mais frequente, atingindo cerca de 98% dos casos da doença. A DAE é uma desordem complexa ou multifatorial associado a influentes fatores genéticos de risco (YU; TAN; HARDY, 2014). Atualmente, o alelo  $\epsilon 4$  do gene *APOE* é considerado o maior fator de risco genético para DAE em diferentes populações (YU; TAN; HARDY, 2014).

No ano de 1993, o gene *APOE* localizado no cromossomo 19q13.2, foi associado ao risco na doença de Alzheimer (CORDER et al., 1993; STRITTMATTER et al., 1993). Segundo Holtzman et al. (2000), o gene *APOE* possui duas variações genéticas (rs429358 e rs7412) levando a formação de três isoformas distintas: ApoE2 ( $\epsilon 2$ ), formado pelos alelos T de rs7412 e T de rs429358; ApoE3 ( $\epsilon 3$ ), formado pelos alelos C de rs7412 e T de rs429358; ApoE4 ( $\epsilon 4$ ), formado pelos alelos C de rs7412 e C de rs429358 (HOLTZMAN et al., 2000; MORGAN; CARRASQUILLO, 2013).

O gene *APOE* codifica a proteína APOE que participa do transporte de colesterol no cérebro, reparo neuronal e na eliminação do peptídeo A $\beta$  do sistema nervoso central (POIRIER, 1994; TOKUDA et al., 2000). O colesterol faz parte da estrutura das células nervosas, como a bainha de mielina dos neurônios (DONG et al., 2017). De acordo com o estudo de Dong et al. (2017) a desregulação da quantidade de colesterol nas células neuronais pode estar relacionada com o funcionamento anormal das enzimas  $\beta$ -secretases e  $\gamma$ -secretases e, conseqüentemente, no desbalanço da formação dos peptídeos A $\beta 40$  e A $\beta 42$ , relacionando assim, seu papel na DA. Segundo estudos, cada cópia do alelo  $\epsilon 4$  causa uma diminuição na idade de aparecimento da doença em até dez anos (FARRER et al., 1997). Além disso, a presença de pelo menos um alelo  $\epsilon 4$  pode aumentar em 3 vezes o risco para DAE (LAMBERT; AMOUYEL, 2011; STRITTMATTER et al., 1993).

## 2.5. Biomarcadores

Segundo Hye et al. (2006) os biomarcadores podem ser atributos morfológicos, de genes, transcritos, peptídeos ou metabólitos presentes no sistema biológico e são definidos pelo grupo *National Institute of Health Director's Initiative on Biomarkers and Surrogate Endpoint* como sendo: indicadores de processos biológicos normais; ou patológicos; ou de respostas a intervenções farmacológicas e objetivamente mensuráveis (ATKINSON et al., 2001). Devido ao difícil diagnóstico da doença de Alzheimer, o uso de biomarcadores pode ser utilizado como auxílio para o diagnóstico complementar, diferenciando-a de outras demências e validando os casos de DA (ATKINSON et al., 2001).

Atualmente, a maioria das pesquisas sobre biomarcadores para a DA utilizam mecanismos de neuroimagem estrutural e funcional, como por exemplo o Imagem por Ressonância Magnética (IRM) e o *Positron Emission Tomography* (PET), mas também há estudos potenciais sobre o uso de biomarcadores bioquímicos (CAVEDO et al., 2014)

A IRM possui boa resolução espacial com a capacidade de distinguir regiões do cérebro, estruturas e até mesmo diferenciar tecidos e camadas corticais, com isso pode ser utilizada para identificar atrofia cerebral em sujeitos com DA. Já o IRM funcional alcança informações como o fluxo sanguíneo de determinada região e metabolismo de glicose. Este método adquire informações sobre o metabolismo do cérebro e visualiza as atividades neuronais em locais específicos, sendo uma ferramenta importante no diagnóstico de DA possibilitando detectar alterações em regiões específicas do cérebro, como o hipocampo (CEDAZO-MINGUEZ; WINBLAD, 2010).

O PET já é utilizado como modalidade de diagnóstico em algumas doenças, como por exemplo o câncer, e produz imagens tridimensionais ou funcionais do organismo. É uma técnica que permite o mapeamento de diferentes substâncias químicas radioativas no organismo (PIKE et al., 2007).

Estudos têm sido realizados com o PIB-PET, uma sonda, marcada com um isótopo radioativo do carbono ( $^{11}\text{C}$ ) específica para se ligar ao peptídeo  $\text{A}\beta$ , o composto B de Pittsburgh ( $^{11}\text{C}$ -PiB - *Pittsburgh compound B*). Os resultados mostraram que as regiões que mais apresentava absorção de PIB, estavam com maior atrofia, como o lobo medial temporal (JACK et al., 2008). Apesar do uso de neuroimagem auxiliar muito para o diagnóstico de doenças, possuem algumas limitações como o alto valor dos aparelhos e difícil interpretação dos dados (SONG et al., 2009).

Os marcadores bioquímicos, na doença de Alzheimer, têm ganhado destaque na última década. No líquido cefalorraquidiano (LCR) ou fluído cérebro espinhal os biomarcadores estudados são o nível da proteína Tau e de peptídeos  $\text{A}\beta$  (REIBER; PETER, 2001). Muitos pesquisadores têm realizado estudos com as proteínas APP, TAU e peptídeo  $\text{A}\beta$ . Os resultados ainda não são consensuais, mas tem sido observada uma diminuição de  $\text{A}\beta_{42}$  em pacientes com DA em relação aos controles. Esta relação sugere que devido a formação das placas de peptídeos  $\text{A}\beta$  na DA há uma redução de peptídeos  $\text{A}\beta$  solúveis circulantes no cérebro e no LCR (CRAIG-SCHAPIRO; FAGAN; HOLTZMAN, 2009).

No entanto, uma das limitações para os biomarcadores no LCR é que a coleta ocorre por punção lombar, e é considerada uma técnica invasiva e que requer cuidados para evitar contaminar o paciente (REIBER; PETER, 2001). Portanto, tem-se buscado biomarcadores, como plasma, sangue e soro pois são menos invasivos e portanto com um custo mais acessível (LISTA et al., 2015).

Assim, nas últimas décadas houve um aumento significativo de pesquisas sobre os mecanismos bioquímicos e moleculares da doença de Alzheimer na busca por biomarcadores. Nesse aspecto, tem ganhado destaque, a busca de polimorfismos de base única (SNP-*Single Nucleotide Polymorphism*) para identificar biomarcadores genéticos que possam ser úteis no diagnóstico complementar de doenças complexas como a DA. (FRIDMAN et al., 2004; KWOK; GU, 1999).

## 2.6. Novos genes candidatos a DAE

Novas variantes genéticas de risco já foram associados com a doença de Alzheimer Esporádica, mas nenhuma como o *APOE*. Estudos de associação amplo do genoma (GWAS - *Genome-wide association study*) identificaram novos SNPs associados ao risco na doença de Alzheimer Esporádica (BUSH; MOORE, 2012). Entre as variantes descobertas, estão o polimorfismo C/A rs670139 do gene *Membrane-spanning 4-domains A4E (MS4A4E)* e o polimorfismo G/C rs9349407 do gene *CD2-associated protein (CD2AP)* estão associados como fatores de risco (HOLLINGWORTH et al., 2011; NAJ et al., 2011b).

### 2.6.1 Gene *MS4A4E*

O gene *Membrane-spanning 4-domain subfamily A4E (MS4A4E)* está localizado no cromossomo 11q12.2 e a família de genes *MS4A* faz parte de componentes da superfície celular (LIANG et al., 2001). O gene *MS4A4E* está implicado na modulação imunológica e está relacionado como sendo parte da via inflamatória na DA (KARCH; GOATE, 2015). Neste aspecto, o estudo de Heneka et al. (2013) correlacionou a ativação de inflamassomas com a redução da fagocitose de placas A $\beta$ . Além disso, as proteínas do gene *MS4A4E* são expressas em micróglia, mas seu mecanismo em DA ainda não está claro (VILLEGAS-LLERENA et al., 2016). As funções do gene *MS4A4E* não estão totalmente caracterizadas, mas podem compartilhar algumas funções/propriedades de proteínas com sua família de genes (LIANG et al., 2001). Foi relatado que a família de genes *MS4A* podem regular a homeostase de cálcio dentro da célula (PAROLINI et al., 2012). Uma vez que altos níveis de cálcio intracelular podem facilitar a formação da placa amilóide e a hiperfosforilação de tau, os genes *MS4A* podem estar relacionados a doenças neurodegenerativas como a DA (LAFERLA, 2002). O alelo A no polimorfismo rs670139 no gene *MS4A4E* foi relacionado ao risco aumentado de desenvolver DAE em estudos de GWAS em populações caucasianas (HOLLINGWORTH et al., 2011; NAJ et al., 2011a). O estudo funcional de Karch et al. (2012) avaliou amostras de cérebros de pacientes com DA e

descobriram que o alelo A em rs670139 *MS4A4E* está associado ao aumento das placas amilóides em pacientes com DA. Isto mostra uma possível relação de rs670139 *MS4A4E* e DAE.

### 2.6.2 Gene *CD2AP*

O gene *CD2-associated protein (CD2AP)* está localizado no cromossomo 6p12 e codifica a proteína CD2AP que regula a endocitose, estrutura do citoesqueleto, adesão de células e tráfico intracelular (LYNCH et al., 2003; PASCALE et al., 2005; TAO et al., 2017). Vários estudos relatam um papel para o CD2AP na doença de Alzheimer. Por exemplo, CD2AP está implicado na via de endocitose o que leva a DA e pode afetar a endocitose da APP em neurônios (UBELMANN et al., 2017). Além disso, esta proteína foi encontrada expressa no cérebro de paciente com DA (SHULMAN et al., 2013) e pode controlar a degradação da APP nos neurônios (TAO et al., 2017).

Em estudos GWAS o alelo C no polimorfismo rs9349407 no gene *CD2AP* foi considerado um fator de risco para DAE em populações caucasianas (HOLLINGWORTH et al., 2011; NAJ et al., 2011a). Em um estudo funcional, o rs9349407 foi correlacionado com o aumento das placas neuríticas o que sugere que o polimorfismo esteja associado com a DA (SHULMAN et al., 2013).

### 2.7. Fatores de risco ambientais

Diversos fatores de risco ambientais estão associados com a doença Alzheimer como por exemplo, a idade, o gênero, o grau de escolaridade e o estilo de vida. A maioria dos casos de doença de Alzheimer, 98%, ocorre após os 65 anos o que indica que a idade é o fator de risco mais importante para a demência (EVANS et al., 1989; STOZICKA; ZILKA; NOVAK, 2007).

Nos estudos de associação caso-controle, verifica-se que a proporção de mulheres com DA é maior em relação os homens. Entretanto, nesta metodologia, os sujeitos são pareados por idade e esta diferença pode ter relação com uma maior expectativa de vida do grupo feminino (NITRINI et al., 2009).

A meta-análise de Barnes e Yaffe (2011) calculou o risco para DA atribuído ao grau de escolaridade e verificou que a prevalência populacional é de 40% (OR= 1.59 ; 95% IC:1.35–1.86). Os resultados mostraram que a baixa escolaridade contribui globalmente para a maior proporção de casos de DA. Além disso, neste mesmo estudo, o tabagismo contribuiu com 27% da prevalência populacional (OR=1.59; 95% IC: 1.15–2.20), seguido pelo sedentarismo com 17% (OR=1.82; 95% IC: 1.19–2.78).

## 2.8. Diagnóstico

A doença de Alzheimer é diagnosticada através dos exames clínicos. Exames complementares são feitos para excluir outras causas de demência. Entretanto, o diagnóstico definitivo só é possível após falecimento do paciente, que é submetido a biópsia cerebral em exame *post-mortem*. Nesta biópsia é possível observar alterações histopatológicas características da doença como a presença de: as placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares nas regiões de hipocampo e neocórtex (HYE et al., 2005). No cérebro destes pacientes também há atrofia cortical, alargamento dos sulcos corticais e dilatação das fissuras sylvianas (Figura 7) (YAARI; COREY-BLOOM, 2007). Estas lesões cerebrais causam a diminuição de sinapses e morte dos neurônios (JELLINGER et al., 2008).

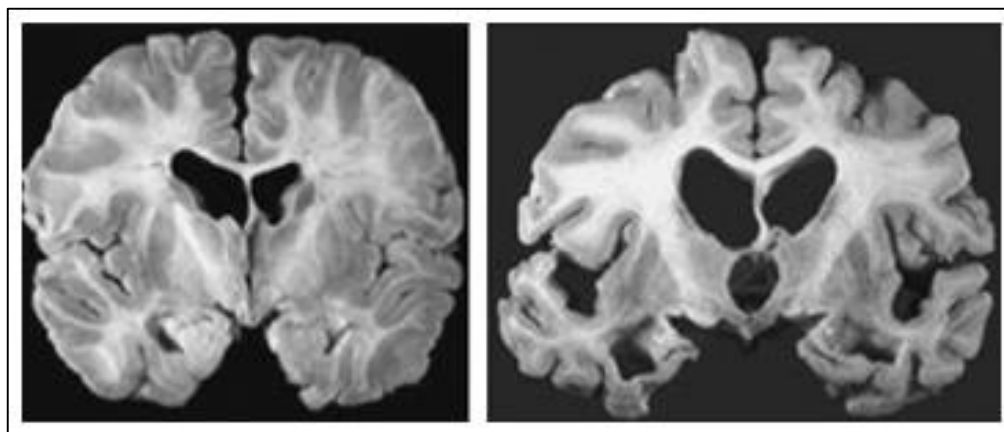


Figura 7: Imagem do cérebro, secção post-mortem, mostrando o cérebro de um indivíduo idoso saudável à esquerda comparado com o de um paciente com DA à direita. (Modificado de YAARI; COREY-BLOOM, 2007).

O método de diagnóstico mais utilizado para DA (FROTA et al., 2011) e o que apresenta maior sensibilidade e especificidade para a doença é feito segundo os critérios do *NINCDS-ADRDA* (*National Institute for Neurological and Communicative Disorders and Stroke –Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association*). Neste critério, os pacientes são diagnosticados como DA provável ou DA possível (MCKHANN et al., 1984).

A doença de Alzheimer provável possui muitas características específicas, como por exemplo, o início insidioso (meses ou anos) e história clara ou observação de piora cognitiva (FROTA et al., 2011). Diferentemente, na DA possível o paciente preenche os critérios de diagnósticos clínicos porém apresenta algumas circunstâncias como, início abrupto e/ou padrão evolutivo distinto daquele observado usualmente, isto é lentamente progressivo, ou quando se tem evidência de outras etiologias (FROTA et al., 2011).

Como os sintomas são progressivos, geralmente, o diagnóstico é feito em estágios avançados da doença (JELLINGER et al., 2008). Portanto, tem sido crescente o estudo de SNPs associados com DAE como métodos no diagnóstico complementar da doença.



## 2.9. Tratamento

Até o momento, a DA é uma doença que não tem cura. Os medicamentos usados no tratamento são antipsicóticos, antidepressivos e ansiolíticos, que tratam os sintomas da DA. Como opção terapêutica no tratamento sintomático da doença de Alzheimer para o déficit cognitivo são usados medicamentos inibidores da acetilcolinesterase (por exemplo: Donepezilo, Galantamina, Rivastigmina) e o antagonista dos recetores N-metil D-Aspartato (NMDA) (memantina) (FORLENZA, 2005).

Uma das causas da DA é baseada na hipótese da Teoria Neuroquímica, que se baseia na diminuição dos níveis de acetilcolina (ACh) nos pacientes (MORRISON; LYKETSOS, 2005). A acetilcolina é um hormônio neurotransmissor produzido pelo sistema nervoso e que está presente nas regiões cerebrais da memória e sua diminuição está correlacionada com o déficit cognitivo (MORRISON; LYKETSOS, 2005). Assim sendo, medicamentos inibidores da enzima acetilcolinesterase tem como objetivo diminuir a degradação de acetilcolina (FORLENZA, 2005). Atualmente, os inibidores das colinesterases são os principais medicamentos usados no tratamento da DA, contudo a resposta ao medicamento é heterogênea, sendo que alguns pacientes se beneficiam muito, enquanto outros, não apresentam melhora (FORLENZA, 2005). Além disso, destaca-se as reações adversas como fadiga, náuseas, vômitos, anorexia, insônia, agressividade, depressão e dores de cabeça (FORLENZA, 2005). No entanto, estudos mostram que a administração dos Inibidores da acetilcolinesterase em doentes com DA induz benefícios significativos, em relação ao grupo controle, sobre as capacidades funcionais e o déficit cognitivo (FORLENZA, 2005).

Já, o uso da memantina, um medicamento antagonista dos recetores NMDA, possui efeitos sobre neurotransmissão glutamatérgica (LI et al., 1997). O glutamato é um neurotransmissor cerebral associado às funções cognitivas e à memória. Assim, na DA, encontra-se níveis alterados de Glutamato e quando os níveis de glutamato ficam elevados por períodos prolongados podem causar morte dos neurônios (FORLENZA, 2005; LI et al., 1997). A memantina possui uma ação neuroprotetora contra a ativação

elevada de receptores NMDA (MISZTAL; FRANKIEWICZ, 1996; PARSONS et al., 1993). Assim sendo, estudos clínicos sugerem que doses diárias de Memantina em portadores de demência leve ou moderada tiveram benefícios significativos sobre as funções motoras e cognitivas (FORLENZA, 2005; PANTEV; RITTER; GORTELMAYER, 1993).

Os estudos de Wenk et al. (2000) e Tariot et al. (2004) sugerem que o tratamento combinado de Memantina e inibidores das colinesterases em pacientes com DA é seguro, bem tolerado e pode favorecer melhoras significativas nas funções cognitivas, funcionais e comportamentais.

#### 2.9.1. Perspectivas futuras

As terapias usadas atualmente mostraram apenas controlar os sintomas e retardar a progressão da doença de Alzheimer. Portanto, é essencial o estudo e desenvolvimento de drogas inovadoras e eficazes que sejam capazes de modificar o curso natural da doença e novas terapias capazes de antecipar o diagnóstico (FORLENZA, 2005). Nesse contexto, estudos que compreendam os mecanismos que levam à morte neuronal na DA serão a base para o desenvolvimento de novas drogas. Assim sendo, destacam-se novas terapias potenciais para a DA, como a imunoterapia ativa.

O estudo de Schenk et al. (1999) foi o pioneiro em descrever a imunização com o A $\beta$  em modelos de camundongos transgênicos. Neste estudo, foi mostrado que a imunização com o A $\beta$ 42 poderia reduzir a deposição de placas amiloides em tecido cerebral. Este trabalho foi clinicamente relevante abrindo a possibilidade de novos estudos sobre imunoterapias com o A $\beta$ .

Em 2001, foi desenvolvida a primeira vacina, AN1792, que consistia no peptídeo total de A $\beta$ 42 com o adjuvante QS-21 (saponina proveniente de extrato de saponária) (FORLENZA, 2005). O primeiro estudo de fase I em humanos voluntários pacientes

de DA, mostrou boa tolerabilidade com a produção de anticorpos específicos em mais de metade dos participantes imunizados. A partir daí foram iniciados os estudos de fase II, a fim de determinar a segurança, a tolerabilidade e a eficácia da imunoterapia com  $\beta$ -amilóide no tratamento da DA.

A fase II contou com 375 voluntários com DA que foram randomizados para receber múltiplas doses intramusculares do composto AN1792 ou placebo. Contudo, apesar de observarem melhorias nos sintomas e redução das placas A $\beta$ , o estudo foi finalizado pois houveram casos de participantes que desenvolveram meningoencefalite (FORLENZA, 2005; ORGOGOZO et al., 2003). Dos 12 pacientes tratados com o composto AN1792 e que apresentaram meningoencefalite quatro pacientes morreram. A autópsia destes pacientes mostrou reduções substanciais dos depósitos de  $\beta$ -amilóide em tecidos cerebrais (ORGOGOZO et al., 2003). Apesar dos efeitos adversos, a vacina AN1792 se mostrou benéfica na DA.

A segunda geração de imunoterapia ativa, CAD106, compreende cópias múltiplas do fragmento de A $\beta$  (A $\beta$ 1-6) conjugado com um bacteriófago (VANDENBERGHE et al., 2017). A vacina CAD106 induziu, em modelos animais, de forma efetiva anticorpos de A $\beta$  sem ativar uma resposta de células T específicas de A $\beta$ . Com base nos resultados, avançou-se para a fase I em humanos. Os resultados mostraram produção necessária de anticorpos sem que houvesse uma reação autoimune. Além disso, houve diminuição da concentração de A $\beta$  livre no plasma (FORLENZA, 2005). A fase II do estudo, 121 pacientes receberam até sete injeções intramusculares de CAD106 (150 $\mu$ g ou 450 $\mu$ g) ou placebo durante 60 semanas (VANDENBERGHE et al., 2017). Esta fase demonstrou um perfil aceitável de segurança e tolerabilidade, evocando uma forte resposta sorológica em até 81% dos pacientes que receberam 450 $\mu$ g de CAD106. Em conclusão, o estudo de fase II mostrou que CAD106 provocou uma resposta imune e um perfil de segurança aceitáveis. Contudo, a eficácia clínica de CAD106 ainda precisa ser determinada em estudos maiores (VANDENBERGHE et al., 2017).

Uma alternativa às vacinas com peptídeo A $\beta$ , são as vacinas de DNA. A vacina de DNA para a DA é composta por um fragmento de DNA que codifica A $\beta$ 42 (LAMBRACHT-WASHINGTON; ROSENBERG, 2013). Diversos estudos pré-clínicos

mostraram que a vacina desencadeia as respostas imunes contra o peptídeo A $\beta$ 42 e induz a produção prolongada de anticorpos (DASILVA; BROWN; MCLAURIN, 2009; KIM et al., 2007; LAMBRACHT-WASHINGTON; ROSENBERG, 2013; MOVSESYAN et al., 2008). Além disso, é mais fácil de ser produzida e com menores custos se comparada com as vacinas de peptídeo A $\beta$  (LAMBRACHT-WASHINGTON; ROSENBERG, 2013). Estes estudos ainda estão em andamento, mas já mostraram resultados promissores de uma potencial forma futura de tratamento preventivo para DA.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

- O objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre os polimorfismos rs9349407 *CD2AP* e rs670139 *MS4A4E* com a doença de Alzheimer esporádica.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a amostra de pacientes com Doença de Alzheimer Esporádica e controles saudáveis quanto à dados demográficos e clínicos;
- Estimar a frequência genotípica dos polimorfismos rs9349407 do gene *CD2AP* e rs670139 do gene *MS4A4E* em pacientes com diagnóstico provável para a DA e controles saudáveis na população de Vitória, ES;
- Verificar a possível associação dos polimorfismos rs9349407 do gene *CD2AP* e rs670139 do gene *MS4A4E* com a doença de Alzheimer na população de Vitória, ES;
- Investigar associação dos SNPs nos genes *CD2AP* (rs9349407) e *MS4A4E* (rs670139) em portadores do alelo  $\epsilon 4$  para o gene *APOE* com a Doença de Alzheimer Esporádica na população da Grande Vitória, ES;
- Verificar a possível associação dos polimorfismos rs9349407 do gene *CD2AP* e rs670139 do gene *MS4A4E* com a doença de Alzheimer Esporádica quando utilizado amostras de diferentes tipos de populações de outros estudos casos-controle.

#### 4. METODOLOGIA

Neste trabalho foram abordadas duas estratégias metodológicas, um estudo de associação caso-controle e um estudo de meta-análise.

##### 4.1. Estudo de Associação

Este foi um estudo de associação transversal, analítico e observacional, realizado em uma amostra de indivíduos não consanguíneos residentes da Grande Vitória, ES atendidos no Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória (HSCMV) ou Centro de Referência de Atendimento ao Idoso (CRAI).

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos. Os participantes do estudo ou representantes legais assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para participar do estudo.

A amostra deste trabalho contou com 221 indivíduos, sendo 82 pacientes e 139 controles. Todos os participantes foram diagnosticados pelo médico geriatra Dr. Renato Lírio Morelato.

Os critérios de inclusão de pacientes na pesquisa foram: indivíduos com diagnóstico Provável de Doença de Alzheimer Esporádica, segundo os critérios de *NINCDS-ADRDA* (MCKHANN et al., 1984). Além disso, foram realizados testes para avaliar nível de cognição como o *Mini Mental State Examination* (MMSE) (FOLSTEIN; FOLSTEIN; MCHUGH, 1975). Os pacientes da pesquisa tiveram escore de 14 a 4 para o *MMSE*. O grupo de pacientes selecionados não tinham parentes com Doença de Alzheimer e apresentavam idade e início de sintomas de demência acima de 65 anos. Os critérios de exclusão de pacientes na pesquisa foram: indivíduos sem diagnóstico Provável de Doença de Alzheimer Esporádica.

Para descartar outras doenças, os pacientes passaram por uma avaliação completa para diagnóstico de demência, incluindo tomografia computadorizada do crânio, testes bioquímicos realizados na época do diagnóstico e repetidos dois anos depois, como hemograma completo, TSH, eletrólitos séricos, vitamina B12, ácido fólico, ureia, glicose sérica e sorologia da sífilis e HIV. Além disso, foram feitos exames clínicos, psiquiátricos e neurológicos para descartar outras doenças cerebrais e sistêmicas que possam contar com o declínio cognitivo progressivo e demências reversíveis (CASTELLANI; ROLSTON; SMITH, 2011).

Os critérios de inclusão de controles na pesquisa foram: indivíduos saudáveis, com a idade acima de 65 anos e ausência de parentes com Doença de Alzheimer. Além disso, todos realizaram o teste *MMSE* e os níveis cognitivos foram considerados não deficientes. Os critérios de exclusão de controles na pesquisa foram: indivíduos com idade inferior a 65 anos e que apresentassem deficiência cognitiva no teste *MMSE*.

A amostra foi caracterizada pelas variáveis de gênero, etnia, escolaridade, idade e o por meio de entrevista aos participantes da pesquisa. O status dos polimorfismos do gene *APOE* foram obtidos por (DE-ALMADA et al., 2012).

#### 4.1.1. Análise genotípica

Foi realizada coleta de sangue na unidade geriátrica do HSCMV pelos pesquisadores do Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM) da UFES. O DNA genômico foi extraído, de 5ml de sangue periférico, de acordo com a metodologia de Miller, Dykes e Polesky (1988). Para medir as concentrações das amostras de DNA foi utilizado o NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

As sequências referências dos genes *CD2AP* e *MS4A4E* utilizadas neste trabalho foram obtidas no banco de dados do site *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (WHEELER et al., 2004).

Os SNPs nos genes *MS4A4E* e *CD2AP* foram investigados através da técnica de

PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*), utilizando primers específicos.

Para a PCR do gene *MS4A4E* foram utilizados os *primers* descritos por Mao et al. (2015). Para a PCR do gene *CD2AP* os *primers* foram desenhados. A sequência do primer *Forward* da fita senso foi elaborada usando a ferramenta do site *dCAPS Finder 2.0*. A sequência do primer *reverse*, foi obtida através do site *Primer3 v. 0.4.0* (NEFF; TURK; KALISHMAN, 2002). O *primer Forward* é degenerado no nucleotídeo G localizado no final do primer. A sequência dos *primers* está apresentada no quadro 1 e as condições da PCR para os genes estão apresentadas no quadro 2. Além disso, a localização das sequências dos *primers* nos genes *MS4A4E* e *CD2AP* e sua especificidade no genoma foram verificadas através do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), ferramenta disponível no site do NCBI.

Quadro 1: Sequência e referência dos *primers* utilizados nas reações de PCR.

Gene	Fragmento	Sequência de <i>Primers</i>	Referência
<b>MS4A4E</b>	255pb	F: AGACGAGCAGAACTGAGAAGC	(MAO et al., 2015)
		R: AAATCCAAGACAGAACAAAGAATC	
<b>CD2AP</b>	212pb	F: AATCTATAGTAGTGTATACTAAG <u>G</u>	(Estudo Atual)
		R: TGTAGGCAACTGTAACACAATGG	

F= Sequência Forward 5'-3', R= Sequência Reverse 5'-3', G= nucleotídeo degenerado.

Quadro 2: Padronização da reação de PCR para os genes em estudo.

SNP	ETAPAS	D	H	E	EF
<i>MS4A4E</i> rs670139	Nº de ciclos	1	25	25	1
	Temperatura	94°C	94°C	66°C	72°C
	Tempo	10min	35s	30s	10min
<i>CD2AP</i> rs9349407	Nº de ciclos	1	35	35	1
	Temperatura	94°C	94°C	56°C	72°C
	Tempo	10min	35s	30s	10min

D=Desnaturação; H=Hibridização; E=Extensão; EF= Extensão final.



A Padronização dos reagentes usados nas reações de PCR e as condições da digestão foram descritas nos quadros 3 e 4, respectivamente. Para a digestão do produto de PCR no gene *CD2AP*, foi utilizado a enzima de restrição *AVAI* (Thermo Fisher) selecionada através da ferramenta do site *dCAPS Finder 2.0*. Para o gene *MS4A4E* foi utilizado a enzima de restrição *BSL1* (Thermo Fisher) selecionada utilizando a ferramenta do site *NEBcutter*.

Quadro 3: Padronização dos reagentes da PCR.

Reagentes	Concentração Final
PCR buffer	1X
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
dNTP	0,2 mM
Primer Forward	0,5mM
primer Reverse	0,5mM
taq DNA polymerase	0,05mM
DNA	40ng/μl

Quadro 4: Condições da digestão.

Gene	Enzima	Tempo/C	Análise	Fragmentos gerados
<i>CD2AP</i>	<i>AVAI</i>	2horas/37°C	Gel poliacrilamida 7%	CC- 212pb; GG- 189pb e 23pb; GC - 212pb, 189pb e 23pb
<i>MS4A4E</i>	<i>BSL1</i>	16horas/55°C	Gel poliacrilamida 7%	AA - 255pb; CC - 171pb e 84pb; CA – 255pb, 171pb e 84pb;

O sequenciamento de Sanger foi realizado em aproximadamente 5% da amostra, para validar os genótipos encontrados. As amostras foram preparadas utilizando 5ul de produto de PCR e *primer Forward* para reagir com BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram sequenciadas no Instituto de Química da USP e o equipamento utilizado foi o ABI PRISM Genetic Analyzer. A análise do sequenciamento foi realizada no software BioEdit v.7.2.5 para Windows.

#### 4.1.2. Análise estatística

Para o grupo de pacientes e controles foi calculado o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EH-W). Foi usada a ferramenta *online* OEGE (*Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies*) com grau 1 de liberdade (RODRIGUEZ; GAUNT; DAY, 2009). Para os grupos estudados foi considerado dentro do EH-W o  $\chi^2 \leq 3,84$  e  $p \geq 0,05$ .

A análise estatística foi realizada no programa SPSS (IBM) software versão 23.0 para Windows. Na caracterização da amostra para comparar a idade entre pacientes e controles foi feito o teste de Mann-Whitney. O teste do Qui-quadrado foi realizado para comparação entre amostras de pacientes e controles com os dados de gênero, etnia, escolaridade e o status do *APOE*. Foi considerado em status do *APOE* a presença de pelo menos um alelo  $\epsilon 4$ . A etnia foi composta por indivíduos de ascendência preferencialmente Caucasiana e Afrodescendente. Para escolaridade, foi considerado alfabetizado e não-alfabetizado. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo nas análises.

Para analisar a associação entre os SNPs nos genes *MS4A4E* (rs670139) e *CD2AP* (rs9349407) com a Doença de Alzheimer, foi realizado o teste do Qui-quadrado, *Odds ratio* (OR) e 95% intervalo de confiança (IC). Além disso, a regressão logística foi feita para testar a associação dos polimorfismos nos genes *MS4A4E* (rs670139) e *CD2AP* (rs9349407) com pelo menos um alelo  $\epsilon 4$  no gene *APOE*. O valor de  $p < 0,05$  na regressão logística foi ajustado usando as variáveis idade, gênero, etnia e nível de escolaridade.

#### 4.2. Meta-análise

##### 4.2.1. Revisão Sistemática

A revisão sistemática foi realizada com o auxílio da pesquisadora Lígia Ramos dos Santos, pertencente ao Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM) utilizando o banco de dados PubMed (NCBI). A busca foi feita de artigos que foram publicados até 12 de dezembro de 2017. As palavras chaves utilizadas foram: "rs670139 MS4A4E", "MS4A4E", "rs9349407 CD2AP" e "CD2AP". Além disso, os estudos referenciados em artigos encontrados na busca também foram incluídos. Somente artigos em inglês foram utilizados.

#### 4.2.2. Critérios de inclusão e exclusão

Foram estabelecidos cinco critérios de inclusão: (1) estudo que investigue uma associação entre DAE e pelo menos um desses SNPs: *CD2AP* (rs9349407) e / ou *MS4A4E* (rs670139); (2) A amostra de pacientes com DAE precisa ter um critério de diagnóstico específico como *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA)*, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM)*, ou *Fourth Edition of Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)*; (3) o estudo precisa fornecer os dados de genótipos ou de alelos dos SNPs, número total de amostras em controles e casos; Quando nenhum desses dados foi fornecido, um e-mail solicitando a informação foi enviado aos autores; (4) os estudos em que as frequências de genótipos estejam dentro do HWE em grupos de casos e controles; (5) estudos que especifiquem o método de genotipagem utilizado. Todos os estudos encontrados que não estavam de acordo com os cinco critérios foram excluídos, assim como os artigos duplicados encontrados na busca.

#### 4.2.3. Extração de dados

Os dados foram extraídos com o auxílio da pesquisadora Lígia Ramos dos Santos, pertencente ao Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM). Os seguintes dados foram extraídos dos artigos selecionados: (1) o sobrenome do primeiro autor; (2) o ano de publicação; (3) o país; (4) a etnia; (4) o número total de pacientes e controles DAE; (5) os números de genótipos ou alelos de cada SNP em casos e controles de DA; (6) o método de genotipagem e (7) os critérios de diagnósticos para pacientes com DAE.

#### 4.2.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa R usando o pacote Meta para meta-análise (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011; SCHWARZER; MAIR; HATZINGER, 2016). Para verificar a associação com DAE por meta-análise usamos todos os estudos do SNP em uma amostra geral. Esta análise também foi realizada dividindo a amostra em subgrupos étnicos.

O Odds Ratio (OR) com 95% de intervalo de confiança (IC) dos polimorfismos rs9349407 *CD2AP* e rs670139 *MS4A4E* foram calculados por comparação alélica seguindo o modelo genético aditivo como segue: rs9349407 *CD2AP* (C versus G) e rs670139 *MS4A4E* (A versus C) (LEWIS; KNIGHT, 2012). Foi considerado que o alelo C de rs9349407 e o alelo A de rs670139, ambos alelos de menor frequência, são alelos de risco.

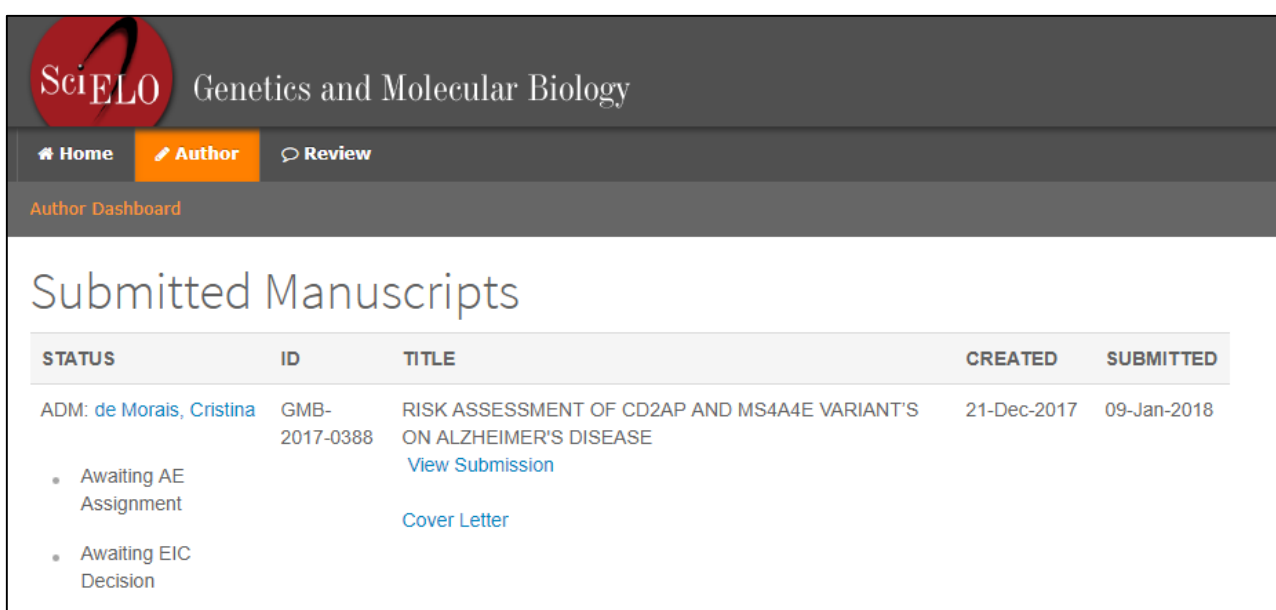
O teste OR foi calculado pelo modelo de efeito fixo e o teste Z para determinar a significância do OR. Foi considerado significativo o valor de  $p \leq 0,05$ .

Para verificar a heterogeneidade foi feito o teste Q e o teste  $I^2$ . Foi considerado como valores significativos de heterogeneidade o valor p do teste Q  $\leq 0,05$  e/ou  $I^2 > 50\%$  (HIGGINS et al., 2003; RODRIGUES; ZIEGELMANN, 2010). Se fosse verificado significância na heterogeneidade, o OR seria calculado com o modelo de efeito Random (DerSimonian-Laird), caso contrário, é mantido o modelo de efeito fixo. Para

avaliar viés de publicação, foi realizado o *funnel plot* e os testes *Begg's* e *Egger's* (HIGGINS et al., 2003; RODRIGUES; ZIEGELMANN, 2010).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O item Resultados e Discussão serão mostrados na forma de artigo científico de acordo com os critérios estipulados pelo Regimento do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. O manuscrito intitulado “*Risk assessment of CD2AP and MS4A4E variant’s on Alzheimer’s Disease*” foi submetido no dia 09 de janeiro de 2018 ao periódico *Genetics and Molecular Biology*.



SciELO Genetics and Molecular Biology

Home Author Review

Author Dashboard

### Submitted Manuscripts

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
ADM: <a href="#">de Moraes, Cristina</a>	GMB-2017-0388	RISK ASSESSMENT OF CD2AP AND MS4A4E VARIANT'S ON ALZHEIMER'S DISEASE <a href="#">View Submission</a> <a href="#">Cover Letter</a>	21-Dec-2017	09-Jan-2018
<ul style="list-style-type: none"> <li>Awaiting AE Assignment</li> <li>Awaiting EIC Decision</li> </ul>				

Figura 8: Comprovante de submissão do manuscrito ao periódico *Genetics and Molecular Biology*.

## RISK ASSESSMENT OF *CD2AP* AND *MS4A4E* VARIANT'S ON ALZHEIMER'S DISEASE

Jucimara Ferreira Figueiredo Almeida<sup>1,2</sup>, Lígia Ramos dos Santos<sup>1</sup>, Lúcia Helena Sagrillo Pimassoni<sup>3</sup>, Maira Trancozo<sup>1,2</sup>, Renato Lírio Morelato<sup>3,4</sup>, Flavia de Paula<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Núcleo de Genética Humana e Molecular, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil.

<sup>3</sup>Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Vitória, ES, Brazil.

<sup>4</sup>Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Vitória, ES, Brazil.

### **Running Head:** *CD2AP* AND *MS4A4E* VARIANT'S ON AD

E-mail addresses from each author:

Jucimara Ferreira Figueiredo Almeida: jucimarabiology@gmail.com

Lígia Ramos dos Santos: ligia.ramos.santos@gmail.com

Lúcia Helena Sagrillo Pimassoni: luciasagrillo@hotmail.com

Maíra Trancozo: mairatrancozo@hotmail.com

Renato Lírio Morelato: renato.morelato@hotmail.com

Flavia de Paula: flapvit@yahoo.com.br

Corresponding author: Flavia de Paula

Laboratório de Genética Humana e Molecular

Departamento de Ciências Biológicas, CCHN

Universidade Federal do Espírito Santo

Av. Fernando Ferrari, 514, Prédio Lydia Behar, sala 102, 29075-910 - Vitória, ES, Brazil

Telephone: (55) 27- 4009-2324, ramal 5324

Email address: flapvit@yahoo.com.br

## Abstract

Genome-wide associations studies (GWAS) reported polymorphisms related with Late-onset of Alzheimer disease (LOAD), a neurodegenerative disorder. The variants rs9349407 *CD2AP* and rs670139 *MS4A4E* are considered risk associated with LOAD on GWAS studies. Though, several association studies did not replicate those variants with impact. Also, there is a gap in information in years between the last meta-analysis and the new case-control studies that were published studying the association of those variants with AD. So, we aimed to address this issue by the association study and meta-analysis of rs9349407 *CD2AP* and rs670139 *MS4A4E* with LOAD in samples from southeastern Brazil. Frequencies from 82 AD patients and 139 healthy elders were matched for sex and age and were assessed by PCR-RFLP. The meta-analysis calculated the strength of association with LOAD by additive genetic model. We did not find association for rs9349407 *CD2AP* with LOAD neither in case-control study nor in meta-analysis. Also, no association was found for rs670139 *MS4A4E* in case-control study. However, the meta-analysis suggests that the A allele of rs670139 *MS4A4E* is risk associated with LOAD. We believe that this work is important to help to validate the role of genetic variants on the risk of AD.

**Keywords:** Association study, Brazilian population, Meta-analysis, *CD2AP*, *MS4A4E*.



## 1. Introduction

Alzheimer disease (AD) is a neurodegenerative disorder and the most common type of dementia, which affect 47 million elders worldwide (PRINCE et al., 2016). Pathological changes occur inside peoples brain's AD, as neurofibrillary tangles, formed inside neurons by tau protein hyperphosphorylation and amyloid plaques whereas amyloid plaques accumulate outside neurons and are formed by A $\beta$ 42 peptides created via *Amyloid Precursor Protein* (APP) gene dysregulation (ASSOCIATION, 2016). Both changes are the main hallmarks of AD and are thought to lead the amyloid cascade hypothesis (SELKOE; SCHENK, 2003).

Most of the AD cases are late-onset AD (LOAD), has multifactorial pattern and occurs later of 65 years (YU; TAN; HARDY, 2014). The  $\epsilon$ 4 allele in *Apolipoprotein E* (*APOE*) gene is considered a worldwide risk factor for LOAD (LAMBERT; AMOUYEL, 2011). Genome-wide associations studies (GWAS) has identified several variants associated with LOAD as rs9349407 *CD2AP* and rs670139 *MS4A4E*, both considered risk polymorphisms to AD (HOLLINGWORTH et al., 2011; NAJ et al., 2011a). Functional studies indicated that both variants are implicated on others pathways that leads to AD, as endocytosis pathway (rs9349407 *CD2AP*) (UBELMANN et al., 2017) and immune pathway (rs670139 *MS4A4E*)(KARCH; GOATE, 2015).

Since is important to corroborate GWAS variant's in different population and to investigate their potential association with LOAD, case-control reports on Asians, Europeans and Americans attempt to replicated those variants. However, not all reached significance (CARRASQUILLO et al., 2011; MAO et al., 2015; MIYASHITA et al., 2013; OMOUMI et al., 2014; TAN et al., 2013; WANG et al., 2014). Also, various case-control articles investigating the association of those variants were published recently and are crucial to update data concerning LOAD associations with rs9349407 *CD2AP* and rs670139 *MS4A4E* in large studies. Therefore, the main goal of this study was to investigate a possible association of rs9349407 *CD2AP* and rs670139 *MS4A4E* with late-onset AD by association study in samples from southeastern Brazil and an update meta-analysis.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Association study:

#### Subjects

This association study has a total of 221 unrelated individual's participants. Healthy elders included 139 individuals matched by sex and age. Patients included 82 individuals diagnosed with probable AD with LOAD according to the criteria of National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA). Also, patients were diagnosed with a comprehensive diagnostic evaluation for dementia and fulfilled others criteria such Mini-Mental State Examination (MMSE) with a score of 14-4. The healthy elders scored >28 on MMSE.

The participants were from Grande Vitória, a metropolitan region of Espírito Santo at the southeast of Brazil. The elders were assisted and diagnosed by a geriatrician at Geriatric Unity of the Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória (HSCMV) and Centro de Atendimento ao Idoso (CRAI), Espírito Santo, Brazil. The participants or their relatives provided a written informed consent before participation in the study as well as information regarding age, gender, ethnical background composition and schooling.

The study was accepted by the Committee of Ethics in Human Research of Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Brazil.

#### Blood sampling and genotyping

The peripheral blood was collected into a 5-ml tube with 5% of EDTA at Geriatric Unity of HSCMV and CRAI. After collection, it was stored at 4°C prior analysis. The genomic DNA was extracted according with previously methodology (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988).

The rs670139 polymorphism in *MS4A4E* gene was determined by conventional *polymerase chain reaction-restriction* fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The primers used were described by Mao et al. (2015) study. PCR products were

subjected to digestion at 55°C by 16 hours with *BSL 1* enzyme (Thermo Scientific). The digestion products were electrophoresed on a 7% polyacrylamide gel stained with silver nitrate.

The rs9349407 polymorphism in *CD2AP* gene was determined by PCR-RFLP using degenerated primers.

The forward primer (5'-AATCTATAGTAGTGTATACTAAG-3') was designed by *dCAPS Finder 2.0*. program (NEFF; TURK; KALISHMAN, 2002) with a G nucleotide degenerated in the end to form the restriction site (GGWCC) for the enzyme *AVAI* (Thermo Scientific). The reverse primer (5'- TGTAGGCAACTGTAACACAATGG -3') was not degenerated and it was designed by Primer3 v. 0.4.0 program (ROZEN; SKALETISKY, 2000). After amplification, the PCR products were subjected to digestion at 37°C by 2 hours with *AVAI* enzyme. Digestion products followed the same protocol used on rs670139 *MS4A4E* for electrophoresis.

#### Sanger sequencing

The three standard genotypes identified in *CD2AP* (rs9349407) and *MS4A4E* (rs670139) were validated by Sanger sequencing performed on the ABI PRISM® 3130XL Genetic Analyzer /HITACHI at Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SPSS (IBM) software v.23.0 for Windows. The  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant for all statistical analysis. Chi-square test with odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI) was performed to test the association between AD and *CD2AP* (rs9349407) and *MS4A4E* (rs670139). Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) was calculated with 1 degree of freedom. Logistic regression was performed to associate AD and polymorphisms in *CD2AP* (rs9349407) and *MS4A4E* (rs670139) with at least one  $\epsilon 4$  allele. Allele frequency of the *APOE* status was inferred in our previously study (2012). The p-value from logistic regression was adjusted using ethnic background, age, gender and school level as variables.

Differences in gender, schooling, *APOE* status and ethnic background

composition among AD patients and non-dementia individuals were evaluated by Chi-square test ( $\chi^2$ ). Concerning education, participants were considered literate or illiterate. Apropos of APOE status, carries of at least one  $\epsilon 4$  allele were considered  $\epsilon 4 +$ , whereas those who carried no  $\epsilon 4$  allele were considered for  $\epsilon 4 -$ . Mann-Whitney test was performed comparing age among AD patients and healthy individuals.

## 2.2 Meta-analysis:

### Search strategy

We searched for articles at PubMed database that were published up to December 12<sup>th</sup>, 2017. For articles that investigated rs670139 polymorphism, the key word used was "rs670139 MS4A4E" and "MS4A4E". For rs9349407, the keyword used was "rs9349407 CD2AP" and "CD2AP". Also, studies referenced in articles found by the search were also used to investigate for further relevant articles. Only articles written in English were selected.

### Inclusion and exclusion criteria

The inclusion criteria was: (1) the study had to investigated the association between *CD2AP* (rs9349407) and/or *MS4A4E* (rs670139) with LOAD; (2) patients sample from study had to fulfill the criteria of NINCDS-ADRDA or the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM); (3) the study had to provide genotype numbers of rs9349407 and/or rs670139 or alleles numbers followed by total number of sample used in case and controls; when we didn't obtained the data, an email was sent to the authors requesting the information; (4) the study had to has genotype frequencies in HWE in case and controls; (5) the study had to indicate the genotyping method used. Studies that did not follow all the criteria mentioned and were duplicated publication were excluded.

### Data extraction

Two researchers extracted the following information from the selected articles:

(1) the last name of first author; (2) the year of publication; (3) the country; (4) the ethnicity; (5) the total numbers of LOAD patients and controls; (6) the genotype numbers or alleles of each SNP in AD cases and controls; (7) the genotyping method; (8) the inclusion criteria for LOAD patients.

### Statistical analysis

The statistical analysis was performed by Review Manager v.5.3 software for Windows and R Package for meta-analysis (Meta). The ORs with 95% IC of rs9349407 *CD2AP* and rs670139 *MS4A4E* were calculated by allelic comparison following the additive genetic model of C versus G and for A versus C, respectively. We assumed that C allele of rs9349407 and T allele of rs670139, both minor's alleles frequency, are high-risk alleles. The OR was calculated by the fixed-effect model (Mantel-Haenszel). Z-test was used to determine the significance of OR (p value considered was  $\leq 0.05$ ). To investigate heterogeneity, Q test and  $I^2$  test were performed. A p value of Q test  $\leq 0.05$  and  $I^2 > 50\%$  were considered significant levels of heterogeneity (HIGGINS et al., 2003). If no significance heterogeneity, fixed effect model is maintained, otherwise, the OR is calculated with random-effect model (DerSimonian-Laird). To evaluate publication bias, Begg's funnel plot and Egger's test were applied (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011; SCHWARZER; MAIR; HATZINGER, 2016).

### 3. Results

#### 3.1 Association study:

Information of ethnical background composition, schooling, age, gender and *APOE* status are shown in Table 1. As estimated, a significance difference was observed for *APOE* frequencies whereas no significance difference for schooling, age, gender and ethnical background composition. The rs670139 *MS4A4E* and rs9349407 *CD2AP* were in Hardy-Weinberg Equilibrium for patients and controls.

The genotype frequencies of rs670139 *MS4A4E* and rs9349407 *CD2AP* in the sample are presented in Table 2. No significant difference between healthy controls and AD patients was observed for rs670139 *MS4A4E* and rs9349407 *CD2AP* genotypes. The logistic regression analysis is demonstrated at Table 2. The genotypes frequency of both variants did not show significance differences between healthy controls and AD patients, nor after adjusting for schooling, ethnical background composition, age, gender and *APOE* status.

#### 3.2 Meta-analysis:

A flow chart of the search of articles is described in figure S1 of supplementary data. We found 387 articles in total and excluded 382 articles that were not in agreement with the inclusion criteria. We selected 5 articles to perform the meta-analysis. Some articles had more than one case-control study. In total, it was included 8 case-control studies for rs670139 *MS4A4E* and 10 case-control studies for rs9349407 *CD2AP*, including our current study. Data information of the selected studies is shown in table S1.

The meta-analysis results are presented in table 3. No association with LOAD was observed for rs9349407 *CD2AP* ( $p=0.77$ ) using additive genetic model (C versus G). For rs670139 *MS4A4E*, it was observed a significant association with LOAD ( $p=0.0004$ ) using A versus C model. We did not identify any significance heterogeneity

among studies of rs670139 *MS4A4E* ( $p=0.15$ ,  $I^2=35\%$ ) and rs9349407 *CD2AP* ( $p=0.32$ ,  $I^2=13\%$ ). The forest plot of rs670139 *MS4A4E* and rs9349407 *CD2AP* are shown in figure S2 and figure S3 respectively. For publication bias analysis, a funnel plot for rs9349407 *CD2AP* (figure S4) and rs670139 *MS4A4E* (figure S5) was performed. Both variants had a symmetric funnel, indicating no publication bias for rs9349407 *CD2AP* (Begg's test  $p=0.4208$ , Eggers's test  $p=0.4132$ ) and rs670139 *MS4A4E* (Begg's test  $p=0.08326$ , Eggers's test  $p=0.1154$ ).

## 4. Discussion

GWAS studies published numerous genes associates with LOAD. Among them, *MS4A4E* and *CD2AP* genes have risk variants, rs670139 and rs9349407, respectively, associated with Alzheimer's disease in GWAS studies (HOLLINGWORTH et al., 2011; NAJ et al., 2011a). However, those GWAs studies were performed in Caucasians populations and is not well established if those associations can be generalize for different populations. In the present study, we evaluated the association of those variants with LOAD in a case-control study and meta-analysis. We only found association for rs670139 *MS4A4E* with AD in meta-analysis.

The *CD2-associated protein (CD2AP)* gene is located on chromosome 6p12 and encodes a protein CD2AP that regulates endocytosis (TAO et al., 2017), cytoskeletal structure (LYNCH et al., 2003), adhesion of cells and intracellular trafficking (PASCALE et al., 2005). Several studies report a role for CD2AP in Alzheimer's disease. For instance, CD2AP is implicated in the endocytosis pathway that leads to AD and may affect the endocytosis of APP in neurons (UBELMANN et al., 2017). Also, this protein was found expressed in AD patient's brains (SHULMAN et al., 2013) and may controls the APP degradation in dendrites brain's (TAO et al., 2017).

The C allele in rs9349407 polymorphism in *CD2AP* gene was considered a risk factor for LOAD in GWAS studies (HOLLINGWORTH et al., 2011; NAJ et al., 2011a). In functional study, the rs9349407 *CD2AP* was correlated with the increase of neuritic plaques (SHULMAN et al., 2013). However, the replication of this variant was not validated by all genetic studies. The Asians studies of Xiao et al. (2015) and Jiao et al. (2015) reported risk association of rs9349407 *CD2AP* with LOAD in Han Chinese (n=1,210) and Mainland China population (n=547), respectively. Our study results are corroborated with others (CARRASQUILLO et al., 2011; OMOUMI et al., 2014; TAN et al., 2013; WANG et al., 2014) studies that also did not found association of this variant with LOAD. The Caucasians populations studies of Omoumi et al. (2014) and Carrasquillo et al. (2011) found no relation concerning rs9349407 *CD2AP* and LOAD in a sample formed by two Canadian cohorts (n= 2,864) and in six sets of sample from United States and Europeans populations (n= 6,835), respectively. Interestingly, the meta-analysis of Chen et al. (2015) found risk association of rs9349407 *CD2AP* with Late-Onset AD in a sample with Asians, Canadians, Americans and Europeans



populations (n=54,936). It was noted that the only studies used by the authors (2015) that were associated with LOAD were mainly Caucasian studies used by the GWAS studies. Differently, our meta-analysis did not found relation, maybe due less sample gathering since many case-control articles don't release all crucial data to perform the analysis. Hence, concerning the relation of rs9349407 *CD2AP* and LOAD, we observed a positive association in large sample analysis with mixture ethnics population (CHEN et al., 2015). However, in separated ethnics populations, the association is not consensual (CARRASQUILLO et al., 2011; JIAO et al., 2015; OMOUMI et al., 2014; TAN et al., 2013; WANG et al., 2014; XIAO et al., 2015). This may be due different statistical analysis among studies that could lead to different results or the genetic characteristics of the population itself. For instance, Brazilian population is a mixture of Iberians Caucasians, Native Americans and West Africans (LINS et al., 2010; PENA et al., 2011). Since each population varies on allele frequency of each genetic marker, the variant could have different association across each ethnic population.

The *Membrane-spanning 4-domain subfamily A4E (MS4A4E)* gene is located on chromosome 11q12.2 and is part of the *MS4A* gene family of cell-surface proteins (LIANG et al., 2001). The *MS4A4E* gene is implicated in immune modulation and is related as being part of the immune pathway to AD (KARCH; GOATE, 2015). Also, *MS4A4E* gene's proteins are expressed on microglial cells but its mechanism on AD is not clear yet (VILLEGAS-LLERENA et al., 2016). The *MS4A4E* functions are not fully characterized but could share some proteins functions/properties with his gene family (LIANG et al., 2001). The *MS4A* gene was reported to regulate calcium homeostasis inside the cell (PAROLINI et al., 2012). Since high levels of intracellular calcium may facilitates amyloid plaque formation and hyperphosphorylation of tau (LAFERLA, 2002), *MS4A* gene may be related to neurodegenerative diseases as AD.

The A allele in rs670139 polymorphism in *MS4A4E* gene was reported for risk for LOAD in GWAS studies in Caucasians populations (HOLLINGWORTH et al., 2011; NAJ et al., 2011a). The functional study of Karch et al. (KARCH et al., 2012) assessed samples of parietal lobes from autopsied AD brains and found that A allele in rs670139 *MS4A4E* is associated with Clinical dementia rating (CDR), increased Braak tangle score and Braak plaque score in AD patients. This correlates a possible relation of rs670139 *MS4A4E* and LOAD. In genetic studies, so far, only four case-control studies investigated this loci variant, all in Asian population. Tan et al. (2013) and Wang et al.

(2014) reported that A allele in rs670139 *MS4A4E* is associated with LOAD in a sample of 1224 individuals of Northern Han Chinese and 1509 individuals in a combined sample of East Han Chinese and Southwest Han Chinese population and East population alone, respectively. However, in both studies, results did not remain significant after Bonferroni correction. Our case-control study did not find association of this variant with AD as the study of Mao et al. (2015) in an East Asian population and Miyashita et al. (2013), in a Japanese population. In the investigation of meta-analysis of Mao et al. (2015), it was not found association for rs670139 with LOAD in a population formed by three Asians studies (n=3,214). Our meta-analysis observed that A allele of rs670139 *MS4A4E* is risk for LOAD in a larger sample formed by eight studies (n=13,001) being Asians and Caucasians studies, including our case-control study. The study of Ji et al. (2015) also found association for LOAD in a sample formed by Asians and Caucasians. We believe that perhaps the effect of rs670139 *MS4A4E* in LOAD is small and it is necessary a greater sample to detect his overall influence. Besides, more case-control studies in different populations are important to better elucidate this variant relation with LOAD.

In conclusion, our case-control study did not find association of rs670139 *MS4A4E* and rs9349407 *CD2AP* with LOAD. Though, our meta-analysis suggests risk for rs670139 *MS4A4E* with late-onset AD. We believe our study is important to help elucidate the molecular role of variants on AD pathway. Also, the replication of GWAS variant's in different population is crucial to validate a risk marker discovery.

## 5. Conclusion

Our data of case-control study demonstrate that rs670139 *MS4A4E* and rs9349407 *CD2AP* are not associated with LOAD in a southeastern Brazilian population. The meta-analysis of rs670139 *MS4A4E* suggests risk for LOAD.

## Appendix A. Supplementary data

The supplementary data related with this article as Table S1, Figure S1, Figure S2, Figure S3, Figure S4 and Figure S5, can be found in the online version.

## Author's contributions

Jucimara Ferreira Figueiredo Almeida and Flavia de Paula were the principal researchers and wrote the manuscript in assistance of Lígia Ramos dos Santos. The experimental procedures were performed by Jucimara Ferreira Figueiredo Almeida in assistance of Maíra Trancozo. The meta-analysis study was performed by Jucimara Ferreira Figueiredo Almeida and Lígia Ramos dos Santos. Renato Lírio Morelato is the physician that gave support and helped with the clinical assessment of the recruited subjects. Lúcia Helena Sagrillo Pimassoni contributed to the statistical analyses. Flavia de Paula gave technical support for the experiment procedures. All of the authors contributed in manuscript, read and accepted it before submission.

## Acknowledgments

We appreciate assistance and technical support by the researches on Núcleo de Genética Humana e Molecular – NGHM and Professor Dr. Francisco Candido

Cardoso Barreto. The study was financially supported by Universidade Federal do Espírito Santo – UFES; Fundo de Amparo e Pesquisa do Espírito Santo – FAPES; Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde - Decit; Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde - SCTIE/MS; Fundo de Apoio à Ciência e Tecnologia do Município de Vitória - FACITEC; Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ; Ministério da Educação – MEC and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

### **Disclosure Statement**

The authors declare no conflict of interest.

## References

- ALMADA, B. V. P. et al. Protective effect of the APOE-e3 allele in Alzheimer's disease. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 45, n. 1, p. 8–12, jan. 2012.
- ASSOCIATION, A. Alzheimer's Disease Facts and Figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 12, n. 4, 2016.
- CARRASQUILLO, M. M. et al. Replication of EPHA1 and CD33 associations with late-onset Alzheimer's disease: a multi-centre case-control study. **Mol Neurodegener.**, v. 6, p. 54, 2011.
- CHEN, H. et al. Analyzing 54,936 Samples Supports the Association Between CD2AP rs9349407 Polymorphism and Alzheimer's Disease Susceptibility. **Molecular Neurobiology**, v. 52, n. 1, p. 1–7, 2015.
- HIGGINS, J. P. T. et al. Measuring inconsistency in meta-analyses. **BMJ : British Medical Journal**, v. 327, n. 7414, p. 557–560, 2003.
- HOLLINGWORTH, P. et al. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. **Nature Genetics**, v. 43, n. 5, p. 429–435, 3 abr. 2011.
- Jl, W. et al. Meta-analysis of association between the genetic polymorphisms on chromosome 11q and Alzheimer's disease susceptibility. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 10, p. 18235–18244, 2015.
- JIAO, B. et al. Polygenic analysis of late-onset Alzheimer's disease from mainland China. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–10, 2015.
- KARCH, C. M. et al. Expression of Novel Alzheimer's Disease Risk Genes in Control and Alzheimer's Disease Brains. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.
- KARCH, C. M.; GOATE, A. M. Alzheimer's Disease Risk Genes and Mechanisms of

Disease Pathogenesis. **Biological Psychiatry**, v. 77, n. 1, p. 43–51, jan. 2015.

LAFERLA, F. M. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. **Nature reviews Neuroscience**, v. 3, n. 11, p. 862–872, 2002.

LAMBERT, J. C.; AMOUYEL, P. Genetics of Alzheimer's disease: New evidences for an old hypothesis? **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 21, n. 3, p. 295–301, 2011.

LIANG, Y. et al. Structural organization of the human MS4A gene cluster on Chromosome 11q12. **Immunogenetics**, v. 53, n. 5, p. 357–68, jul. 2001.

LINS, T. C. et al. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty eight ancestry informative SNPs. **American Journal of Human Biology**, v. 22, n. 2, p. 187–192, 2010.

LYNCH, D. K. et al. A cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 24, p. 21805–21813, 2003.

MAO, Y. F. et al. Association of CD33 and MS4A cluster variants with Alzheimer's disease in East Asian populations. **Neuroscience Letters**, v. 609, p. 235–239, 2015.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MIYASHITA, A. et al. SORL1 Is Genetically Associated with Late-Onset Alzheimer's Disease in Japanese, Koreans and Caucasians. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

NAJ, A. C. et al. Common variants in MS4A4/MS4A6E, CD2uAP, CD33, and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease Adam. **Nature genetics**, v. 43, n. 5, p. 436–441, 2011.

NEFF, M. M.; TURK, E.; KALISHMAN, M. **Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis** *Trends in Genetics*, 2002.

OMOUMI, A. et al. Evaluation of late-onset Alzheimer disease genetic susceptibility risks in a Canadian population. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 4, p. 936.e5-936.e12, 2014.

PAROLINI, D. et al. Expression of CD20 reveals a new store-operated calcium entry modulator in skeletal muscle. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, n. 12, p. 2095–2105, dez. 2012.

PASCALE, M. et al. G Protein-coupled Receptor Kinase 2-mediated Phosphorylation of Ezrin Is Required for G Protein-coupled Receptor-dependent Reorganization of the Actin Cytoskeleton. **Molecular biology of the cell**, v. 16, n. 8, p. 1–13, 2005.

PENA, S. D. J. et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

PRINCE, M. et al. **World Alzheimer Report 2016: Improving healthcare for people living with dementia**. London: Alzheimer's Disease International (ADI), 2016.

R DEVELOPMENT CORE TEAM, R. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. [s.l.: s.n.]. v. 1

ROZEN, S.; SKALETISKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 132, p. 365–386, 2000.

SCHWARZER, G.; MAIR, P.; HATZINGER, R. meta : An R Package for Meta-Analysis. **R News**, v. 7, p. 40–45, 2016.

SELKOE, D. J.; SCHENK, D. ALZHEIMER'S DISEASE : Molecular Understanding Predicts Amyloid-Based Therapeutics. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 545–584, abr. 2003.

SHULMAN, J. M. et al. Genetic susceptibility for Alzheimer disease neuritic plaque pathology. **JAMA neurology**, v. 70, n. 9, p. 1150–7, 2013.

TAN, L. et al. Association of GWAS-linked loci with late-onset Alzheimer's disease in a northern Han Chinese population. **Alzheimer's and Dementia**, v. 9, n. 5, p. 546–553, 2013.

TAO, Q.-Q. et al. Decreased gene expression of CD2AP in Chinese patients with sporadic Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, p. 2–7, 2017.

UBELMANN, F. et al. Bin1 and CD2AP polarise the endocytic generation of beta-amyloid. **EMBO reports**, v. 18, n. 1, p. 102–122, 2017.

VILLEGAS-LLERENA, C. et al. Microglial genes regulating neuroinflammation in the progression of Alzheimer's disease. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 36, p. 74–81, fev. 2016.

WANG, H. Z. et al. Validating GWAS-Identified Risk Loci for Alzheimer's Disease in Han Chinese Populations. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 1, p. 379–390, 2014.

XIAO, Q. et al. Risk prediction for sporadic Alzheimer ' s disease using genetic risk score in the Han Chinese population. v. 6, n. 35, 2015.

YU, J. T.; TAN, L.; HARDY, J. Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease: An Update. **Annual Review of Neuroscience**, v. 37, n. 1, p. 79–100, 2014.



**Supplementary material - the following online material is available for this article:**

Table S1 - Meta-analysis data of rs670139 *MS4A4E* and rs9349407 *CD2AP*.

Figure S1 - Flow chart of articles found on Pubmed database.

Figure S2 - Forest plot of the meta-analysis of rs670139 *MS4A4E*.

Figure S3 - Forest plot of the meta-analysis of rs9349407 *CD2AP*.

Figure S4 - Funnel plot of the meta-analysis of rs9349407 *CD2AP*.

Figure S5 - Funnel plot of the meta-analysis of rs670139 *MS4A4E*.

**Table 1. Characteristics of sample.**

Variable	AD Patients 82 (100%)	Controls 139 (100%)	p-value
Gender			
Man	28 (34.1%)	36 (25.9%)	0.192 <sup>a</sup>
Woman	54 (65.9%)	103 (74.1%)	
Schooling			
Literate	44 (53.7%)	89 (64.0%)	0.154 <sup>a</sup>
Illiterate	29 (35.4%)	43 (30.9%)	
No identification	9 (11.0%)	7 (5.0%)	
Ethnic background			
Caucasians	47 (57.3%)	82 (59.0%)	0.159 <sup>a</sup>
Afro-Brazilians	30 (36.6%)	55 (39.6%)	
No identification	5 (6.1%)	2 (1.4%)	
APOE status			
ε4 +	47 (57.3%)	43 (30.9%)	0.000 <sup>a</sup>
ε4 -	35 (42.7%)	96 (69.1%)	
Age (mean and SD)	81 ± 7	80 ± 8	0.186 <sup>b</sup>

AD Patients = Alzheimer's disease patients; ε4 += ε4 carriers; ε4 -= ε4 non-carriers; SD= standard deviation; <sup>a</sup> = AD patient versus control group by x<sup>2</sup> test; <sup>b</sup> = p-value of AD patient versus control group by Mann-Whitney test; p-value ≤ 0.05 considered significant.

**Table 2. Genotypes frequencies and logistic regression analyses of rs670139 *MS4A4E* and rs9349407 *CD2AP*.**

	AD patients	Controls	pvalue <sup>a</sup>	OR (95%CI) <sup>b</sup>	P value <sup>c</sup>	OR (95%CI) <sup>b</sup>	p value <sup>d</sup>
<i>MS4A4E</i>							
CC	38 (46.3%)	56 (40.3%)	0.675	1 (reference)	-	1 (reference)	-
CA	33 (40.2%)	63 (45.3%)		0.77 (0.42 – 1.39)	0.389	0.69 (0.36 – 1.31)	0.261
AA	11 (13.4%)	20 (14.4%)		0.81 (0.34 – 1.88)	0.625	0.72 (0.29 – 1.80)	0.489
Total	82 (100%)	139 (100%)					
<i>CD2AP</i>							
GG	27 (45.0 %)	47 (46.5%)	0.723	1 (reference)	-	1 (reference)	-
GC	30 (50.0%)	46 (45.5%)		1.13 (0.58 – 2.19)	0.706	1.20 (0.58 – 2.49)	0.610
CC	03 (05.0%)	08 (07,9%)		0.65 (0.16 – 2.67)	0.553	0.69 (0.15 – 3.06)	0.629
Total	60 (100%)	101 (100%)					

The numbers with percentages on parenthesis show the proportions of genotypes in AD patient and healthy control; AD Patients = Alzheimer's disease patients; p value considerer ≤ 0.05; <sup>a</sup> = AD patient versus control group by x<sup>2</sup> test; OR = Odds ratio; CI = Confidence interval; <sup>b</sup> = Logistic regression; <sup>c</sup> = Crude p value; <sup>d</sup> = p value adjusted by the variables age, gender, educational attainment, ethnical background and APOE ε4 status.

**Table 3. Meta-analyses of rs670139 *MS4A4E* and rs9349407 *CD2AP*.**

Study	MAF			Meta-analysis				
	AD Patient	Control	OR (95%CI) <sup>a</sup>	OR (95%CI) <sup>ab</sup>	p value <sup>c</sup>	Heterogeneity <sup>d</sup>		
						X <sup>2</sup>	p	I <sup>2</sup>
rs670139 <i>MS4A4E</i> (all studies)				1.10 (1.04-1.15)	0.000	10.71	0.15	35%
Current study	0.33	0.37	0.86 (0.57-1.29)					
Harold et al. (2009) Ireland	0.43	0.40	1.12 (1.04-1.20)					
Harold et al. (2009) Germany	0.41	0.40	1.05 (0.90-1.22)					
Harold et al. (2009) USA	0.43	0.39	1.21 (1.04-1.40)					
Mao et al. (2015)	0.43	0.46	0.86 (0.61-1.22)					
Tan et al. (2013)	0.46	0.41	1.20 (1.02-1.40)					
Wang et al. (2014) East China	0.39	0.41	0.90 (0.74-1.09)					
Wang et at. (2014) Southwest China	0.43	0.42	1.06 (0.86-1.32)					
rs9349407 <i>CD2AP</i> (all studies)				1.01 (0.94-1.09)	0.77	11.45	0.32	13%
Carrasquillo et al. (2011) Aruk	0.27	0.28	0.94 (0.80-1.11)					
Carrasquillo et al. (2011)Autopsy	0.25	0.29	0.86 (0.60-1.23)					
Carrasquillo et al. (2011) Jacksonville	0.28	0.26	1.12 (0.94-1.23)					
Carrasquillo et al. (2011) Norway	0.25	0.27	0.88 (0.70-1.10)					
Carrasquillo et al. (2011) Poland	0.29	0.25	1.21 (0.92-1.59)					
Carrasquillo et al. (2011) Rochester	0.25	0.27	0.91 (0.75-1.11)					
Current Study	0.30	0.30	0.97(0.59-1.58)					
Tan et al. (2013)	0.11	0.11	1.02 (0.80-1.31)					
Wang et al. (2014) East China	0.13	0.10	1.27 (0.95-1.71)					
Wang et al. (2014)Southwest China	0.14	0.12	1.24 (0.90-1.70)					

AD Patients = Alzheimer's disease patients; MAF = minor allele frequency; OR = Odds ratio; CI = Confidence interval; <sup>a</sup> = OR and 95% IC were calculated by additive genetic model, C versus G for rs670139 and T versus G for rs9349407; <sup>b</sup> = calculated by fixed-effect model; <sup>c</sup> = p value of Z-test; <sup>d</sup> = Heterogeneity was calculated with Q test (x<sup>2</sup> test), p value ( $\leq 0.05$  is considered significant) of Q test and I<sup>2</sup> (>50% is considered significant).

## Electronic Supplementary Material

**Table S1.** Meta-analysis data of rs670139 *MS4A4E* and rs9349407 *CD2AP*.

Study	Country	Ethnic	AD diagnosis	Genotype methods	Total Sample	
					AD Patients	Controls
rs670139						
Current study	Brazil	Caucasian	NINCDS-ADRDA	PCR-RFLP	82	139
Harold et al. (2009) Ireland	Ireland	Caucasian	NINCDS-ADRDA	Microarray	2226	4706
Harold et al. (2009) Germany	Germany	Caucasian	NINCDS-ADRDA	Microarray	555	824
Harold et al. (2009) USA	USA	Caucasian	NINCDS-ADRDA	Microarray	551	930
Mao et al. (2015)	China	Asian	NINCDS-ADRDA	PCR-RFLP	126	129
Tan et al. (2013)	China	Asian	NINCDS-ADRDA	Taqman	612	612
Wang et al. (2014) East China	China	Asian	NINCDS-ADRDA	Multiplex PCR	415	426
Wang et al.(2014) Southwest China	China	Asian	NINCDS-ADRDA	Multiplex PCR	333	334
rs9349407						
Carrasquillo et al. (2011) Aruk	Europa	European	NINCDS-ADRDA	Taqman	639	733
Carrasquillo et al. (2011) Autopsy	USA	American	NINCDS-ADRDA	Taqman	285	100
Carrasquillo et al. (2011) Jacksonville	USA	American	NINCDS-ADRDA	Taqman	492	922
Carrasquillo et al. (2011) Norway	Europa	European	NINCDS-ADRDA	Taqman	324	519
Carrasquillo et al. (2011) Poland	Europa	European	NINCDS-ADRDA	Taqman	468	181
Carrasquillo et al. (2011) Rochester	USA	American	NINCDS-ADRDA	Taqman	313	1600
Current Study	Brazil	Caucasian	NINCDS-ADRDA	PCR-RFLP	60	101
Tan et al. (2013)	China	Asian	NINCDS-ADRDA	Taqman	612	612
Wang et al. (2014) East China	China	Asian	NINCDS-ADRDA	Multiplex PCR	415	426
Wang et al. (2014) Southwest China	China	Asian	NINCDS-ADRDA	Multiplex PCR	333	334

AD diagnosis= Alzheimer's disease diagnosis; AD Patients= Alzheimer's disease patients; PCR-RFLP=Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism; NINCDS-ADRDA= National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer Disease and Related Disorders Association

## Electronic Supplementary Material

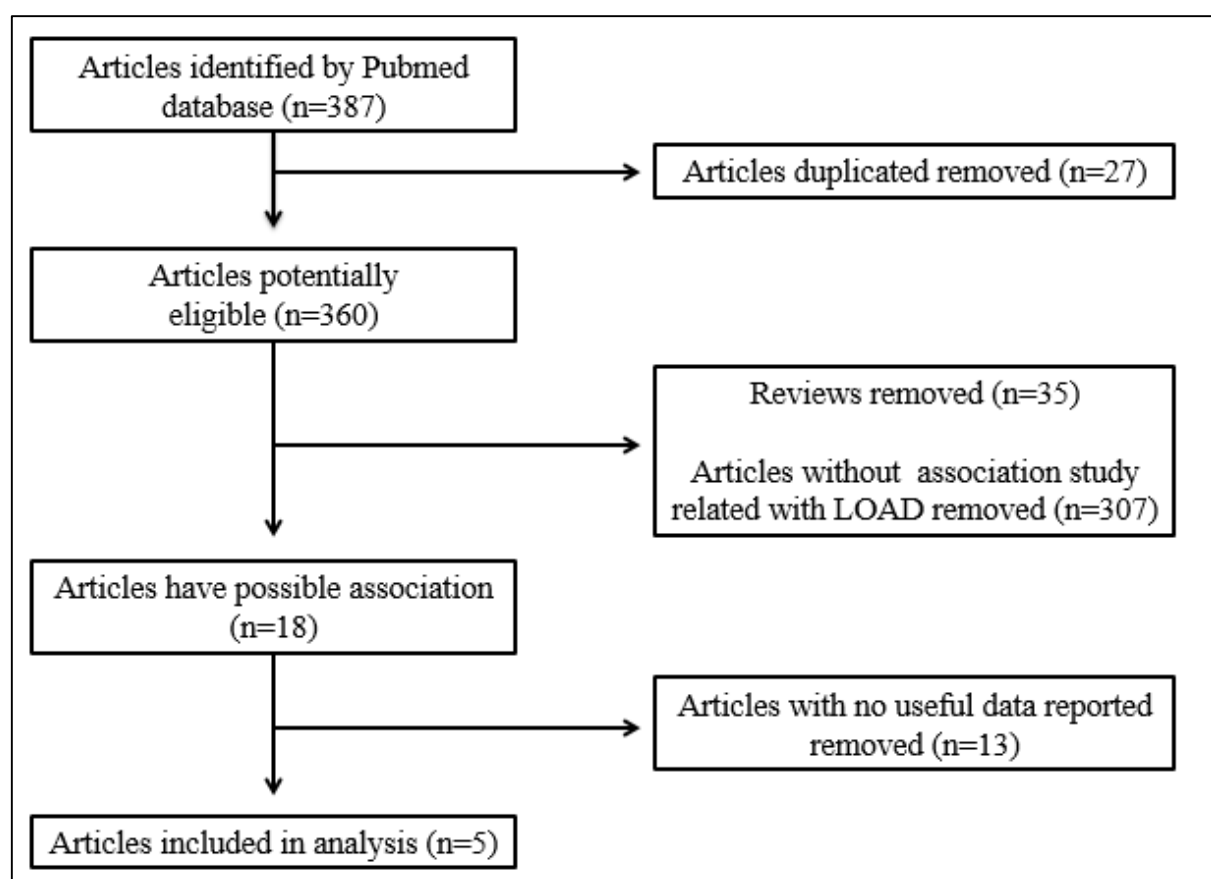
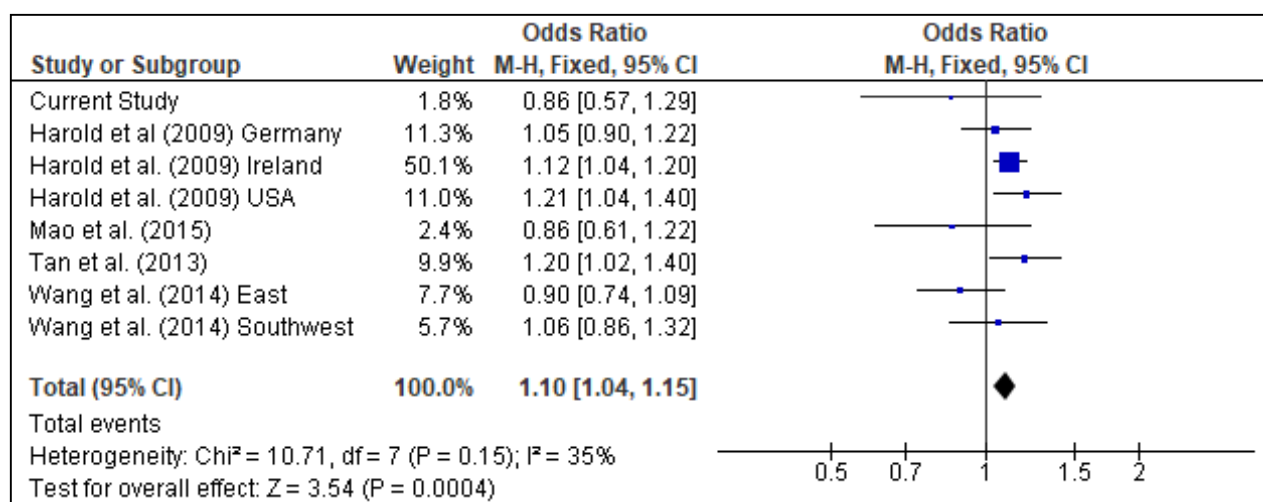
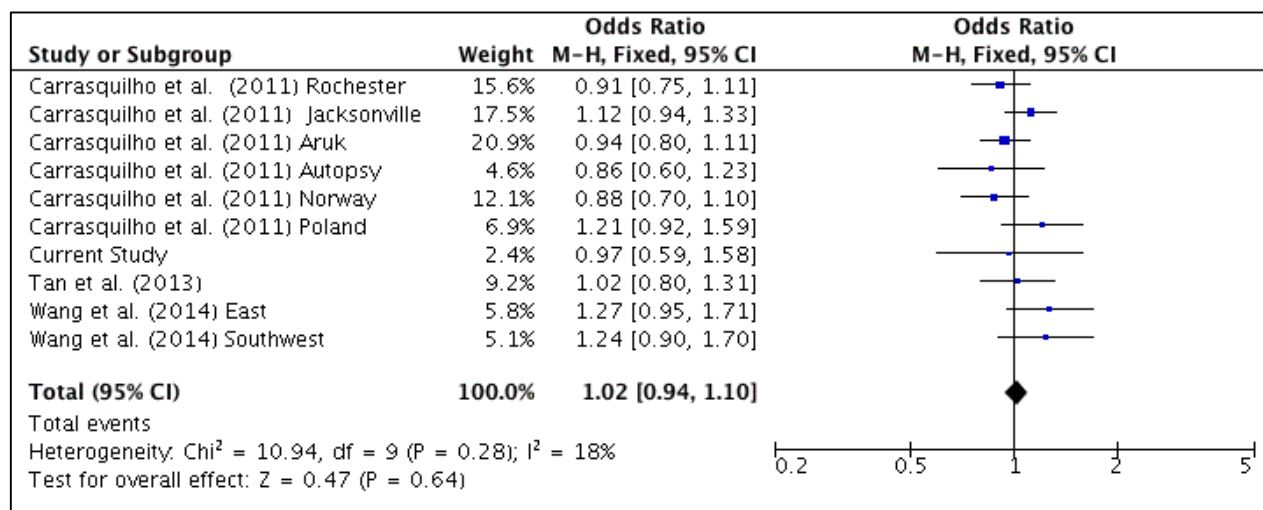


Figure S1. Flow chart of articles found on Pubmed database.

## Electronic Supplementary Material

Figure S2. Forest plot of the meta-analysis of rs670139 *MS4A4E*.Figure S3. Forest plot of the meta-analysis of rs9349407 *CD2AP*.

Electronic Supplementary Material

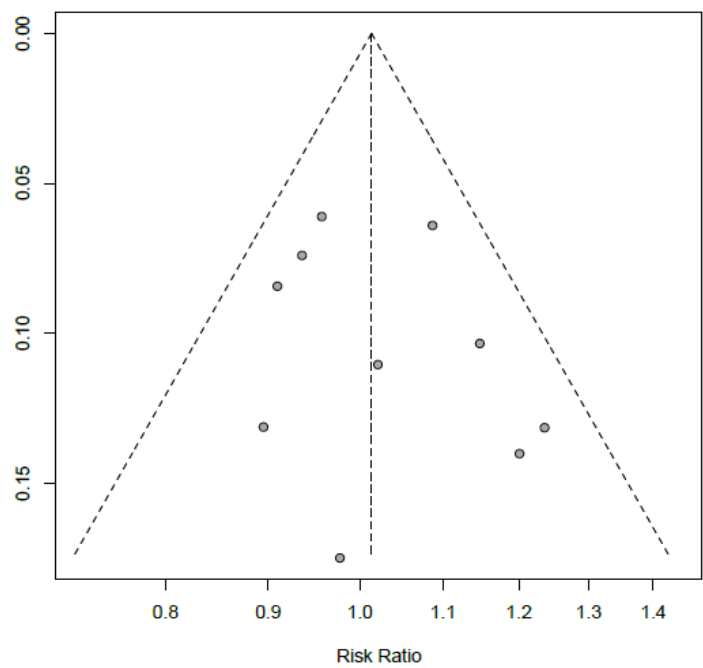


Figure S4. Funnel plot of the meta-analysis of rs9349407 *CD2AP*.

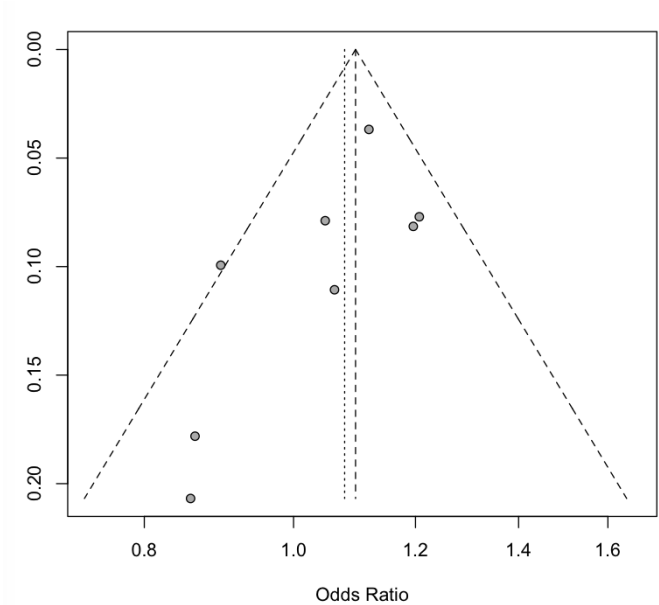


Figure S5. Funnel plot of the meta-analysis of rs670139 *MS4A4E*.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como objetivo avaliar a associação entre os polimorfismos rs9349407 *CD2AP* e rs670139 *MS4A4E* com a doença de Alzheimer na população da Grande Vitória, Es e verificar a possível associação dos polimorfismos quando utilizado amostras de diferentes tipos de populações de outros estudos casos-controle em um estudo de meta-análise. Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

As frequências genotípicas dos polimorfismos rs9349407 *CD2AP* e rs670139 *MS4A4E* não mostraram diferenças significativas entre os grupos pacientes com DA e controles pareados, sugerindo que esses polimorfismos não estão associados com risco para a DA na população da Grande Vitória, ES. Contudo, entre as limitações deste estudo, destaca-se o poder estatístico relativamente baixo dos testes realizados devido ao número amostral pequeno, se comparado com outros estudos de associação.

A meta-análise encontrou associação estatisticamente significativa da variante rs670139 *MS4A4E* com DAE, indicando que essa variante está relacionada com o risco no desenvolvimento da doença. A meta-análise não encontrou associação significativa da variante rs9349407 *CD2AP* com DAE. Estudos futuros são necessários para esclarecer a real associação desta variante e o risco com DAE.

Os dados deste trabalho podem auxiliar, futuramente, no desenvolvimento de um painel de biomarcadores de diagnóstico complementar para a Doença de Alzheimer.



## 8. REFERÊNCIAS

- ALLEN, M. et al. Association and heterogeneity at the GAPDH locus in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 33, n. 1, p. 203.e25-203.e33, jan. 2012.
- ALZHEIMER, A. Uber eigenartige Krankheitsfalle des spateren Alters: (On certain peculiar diseases of old age. **History of Psychiatry**, v. 2, n. 5, p. 74–101, 1991.
- ASSOCIATION, A. Alzheimer's Disease Facts and Figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 12, n. 4, 2016.
- ATKINSON, A. J. et al. **Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework**Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2001.
- AVRAMOPOULOS, D. Genetics of Alzheimer's disease: recent advances. **Genome Medicine**, v. 1, n. 3, p. 34, 2009.
- BARNES, D. E.; YAFFE, K. **The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence**The Lancet Neurology, 2011.
- BERTRAM, L.; LILL, C. M.; TANZI, R. E. **The genetics of alzheimer disease: Back to the future**Neuron, 2010.
- BRION, J. P. **Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease**European Neurology, 1998.
- BRUNDEN, K. R.; TROJANOWSKI, J. Q.; LEE, V. M.-Y. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 10, p. 783–793, out. 2009.
- BUSH, W. S.; MOORE, J. H. Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. **PLoS Computational Biology**, v. 8, n. 12, 2012.
- CAI, X. D.; GOLDE, T. E.; YOUNKIN, S. G. Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. **Science**, v. 259, n. 5094, p. 514–516, 1993.
- CARRASQUILLO, M. M. et al. Replication of EPHA1 and CD33 associations with late-onset Alzheimer's disease: a multi-centre case-control study. **Mol Neurodegener.**, v. 6, p. 54, 2011.
- CASTELLANI, R. J.; ROLSTON, R. K.; SMITH, M. Alzheimer Disease. **Disease a Month**, v. 56, n. 9, p. 1–60, 2011.
- CAVEDO, E. et al. The Road Ahead to Cure Alzheimer's Disease: Development of Biological Markers and Neuroimaging Methods for Prevention Trials Across all Stages and Target Populations. **The journal of prevention of Alzheimer's disease**, v. 1, n. 3, p. 181–202, 2014.

CEDAZO-MINGUEZ, A.; WINBLAD, B. Biomarkers for Alzheimer's disease and other forms of dementia: Clinical needs, limitations and future aspects. **Experimental Gerontology**, v. 45, n. 1, p. 5–14, 2010.

CHEN, H. et al. Analyzing 54,936 Samples Supports the Association Between CD2AP rs9349407 Polymorphism and Alzheimer's Disease Susceptibility. **Molecular Neurobiology**, v. 52, n. 1, p. 1–7, 2015.

CITRON, M. et al. Mutation of the  $\beta$ -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases  $\beta$ -protein production. **Nature**, v. 360, n. 6405, p. 672–674, 1992.

CONDELLO, C.; STOHR, J. A $\beta$  propagation and strains: Implications for the phenotypic diversity in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Disease**, 2016.

CORDER, E. et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. **Science**, v. 261, n. 5123, p. 921–923, 1993.

CRAIG-SCHAPIRO, R.; FAGAN, A. M.; HOLTZMAN, D. M. **Biomarkers of Alzheimer's disease** **Neurobiology of Disease**, 2009.

CUSTODIO, N. et al. Dementia in Latin America: Epidemiological evidence and implications for public policy. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, n. JUL, p. 1–11, 2017.

DASILVA, K. A.; BROWN, M. E.; MCLAURIN, J. A. Reduced oligomeric and vascular amyloid- $\beta$  following immunization of TgCRND8 mice with an Alzheimer's DNA vaccine. **Vaccine**, v. 27, n. 9, p. 1365–1376, 2009.

DE-ALMADA, B. V. P. et al. Protective effect of the APOE-e3 allele in Alzheimer's disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 1, p. 8–12, jan. 2012.

DONG, H. K. et al. **Integrated late onset Alzheimer's disease (LOAD) susceptibility genes: Cholesterol metabolism and trafficking perspectives** **Gene**, 2017.

EVANS, D. A. et al. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. **JAMA**, v. 262, n. 0098–7484, p. 2551–2556, 1989.

FARRER, L. A. et al. **Effects of Age, Sex, and Ethnicity on the Association Between Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease: A Meta-analysis** **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, 1997.

FOLSTEIN, M. F.; FOLSTEIN, S. E.; MCHUGH, P. R. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. **Journal of Psychiatric Research**, v. 12, n. 3, p. 189–198, 1975.

FORLENZA, O. V. **Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer** **Revista de Psiquiatria Clínica**, 2005.

FRIDMAN, C. et al. Alterações genéticas na doença de Alzheimer. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 31, n. 1, p. 19–25, 2004.

FROTA, N. A. F. et al. Critérios para o diagnóstico de doença de Alzheimer. **Dement Neuropsychol**, v. 5, n. Suppl 1, p. 5–10, 2011.

GOATE, A. et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. **Nature**, v. 349, n. 6311, p. 704–6, 1991.

HARDY, J.; HIGGINS, G. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. **Science**, v. 256, n. 5054, p. 184–185, 1992.

HARPER, P. S. Mendelian inheritance or transmissible agent? The lesson Kuru and the Australia antigen. **Journal of medical genetics**, v. 14, n. 6, p. 389–98, dez. 1977.

HEINONEN, O. et al. Loss of synaptophysin-like immunoreactivity in the hippocampal formation is an early phenomenon in alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 64, n. 2, p. 375–384, jan. 1995.

HENEKA, M. T. et al. NIH Public Access. v. 493, n. 7434, p. 674–678, 2013.

HERRERA, E. et al. Epidemiologic Survey of Dementia in a Community-Dwelling Brazilian Population. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, v. 16, n. 2, p. 103–108, abr. 2002.

HIGGINS, J. P. T. et al. Measuring inconsistency in meta-analyses. **BMJ : British Medical Journal**, v. 327, n. 7414, p. 557–560, 2003.

HIPPIUS, H.; NEUNDÖRFER, G. The discovery of Alzheimer's disease. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 101–108, 2003.

HOLLINGWORTH, P. et al. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. **Nature Genetics**, v. 43, n. 5, p. 429–435, 3 abr. 2011.

HOLTZMAN, D. M. et al. Apolipoprotein E facilitates neuritic and cerebrovascular plaque formation in an Alzheimer's disease model. **Annals of Neurology**, v. 47, n. 6, p. 739–747, 2000.

HOLTZMAN, D. M.; MORRIS, J. C.; GOATE, A. M. Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 77, p. 77sr1–77sr1, 2011.

HYE, A. et al. Glycogen synthase kinase-3 is increased in white cells early in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 373, n. 1, p. 1–4, 2005.

HYE, A. et al. Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease. **Brain**, v. 129, n. 11, p. 3042–3050, 29 set. 2006.

IQBAL, K. et al. **Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 2005.

JACK, C. R. et al. <sup>11</sup>C PiB and structural MRI provide complementary information in imaging of Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. **Brain**, v. 131, n. 3, p. 665–680, 2008.

JARRETT, J. T.; BERGER, E. P.; LANSBURY, P. T. The Carboxy Terminus of the  $\beta$  Amyloid Protein Is Critical for the Seeding of Amyloid Formation: Implications for the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Biochemistry**, v. 32, n. 18, p. 4693–4697, 1993.

JELLINGER, K. A. Neuropathological aspects of Alzheimer disease, Parkinson disease and frontotemporal dementia. **Neurodegenerative Diseases**, v. 5, n. 3–4, p. 118–121, 2008.

JELLINGER, K. A. et al. Biomarkers for early diagnosis of Alzheimer disease: "ALZheimer ASSociated gene"- a new blood biomarker? **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 4, p. 1094–1117, ago. 2008.

Jl, W. et al. Meta-analysis of association between the genetic polymorphisms on chromosome 11q and Alzheimer's disease susceptibility. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 10, p. 18235–18244, 2015.

JIAO, B. et al. Polygenic analysis of late-onset Alzheimer's disease from mainland China. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–10, 2015.

KADMIRI, N. et al. Biomarkers for Alzheimer disease: Classical and novel candidates' review. **Neuroscience**, 2017.

KANG, S.; LEE, Y. H.; LEE, J. E. Metabolism-centric overview of the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Yonsei Medical Journal**, v. 58, n. 3, p. 479–488, 2017.

KARCH, C. M. et al. Expression of Novel Alzheimer's Disease Risk Genes in Control and Alzheimer's Disease Brains. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

KARCH, C. M.; GOATE, A. M. Alzheimer's Disease Risk Genes and Mechanisms of Disease Pathogenesis. **Biological Psychiatry**, v. 77, n. 1, p. 43–51, jan. 2015.

KIDSON, C.; CHEN, P. DNA damage, DNA repair and the genetic basis of Alzheimer's disease. **Progress in brain research**, v. 70, n. 0079–6123, p. 291–301, 1986.

KIM, H. D. et al. Enhancing Th2 immune responses against amyloid protein by a DNA prime-adenovirus boost regimen for Alzheimer's disease. **Immunology Letters**, v. 112, n. 1, p. 30–38, 2007.

KOSIK, K. S.; JOACHIM, C. L.; SELKOE, D. J. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 11, p. 4044–8, 1986.

KUMAR, A.; SINGH, A.; EKAVALI. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 2, p. 195–203, abr. 2015.

KWOK, P. Y.; GU, Z. **Single nucleotide polymorphism libraries: Why and how are we building them?** **Molecular Medicine Today**, 1999.

LAFERLA, F. M. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. **Nature reviews Neuroscience**, v. 3, n. 11, p. 862–872, 2002.

LAMBERT, J.-C. et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. **Nature Genetics**, v. 41, n. 10, p. 1094–1099, 6 out. 2009.

LAMBERT, J. C.; AMOUYEL, P. Genetics of Alzheimer's disease: New evidences for an old hypothesis? **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 21, n. 3, p. 295–301, 2011.

LAMBRACHT-WASHINGTON, D.; ROSENBERG, R. N. Advances in the development of vaccines for Alzheimer's disease. **Discovery medicine**, v. 15, n. 84, p. 319–26, 2013.

LEWIS, C. M.; KNIGHT, J. Introduction to genetic association studies. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 7, n. 3, p. 297–306, 2012.

LI, S. et al. Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 56, n. 8, p. 901–11, 1997.

LIANG, Y. et al. Structural organization of the human MS4A gene cluster on Chromosome 11q12. **Immunogenetics**, v. 53, n. 5, p. 357–68, jul. 2001.

LINS, T. C. et al. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty eight ancestry informative SNPs. **American Journal of Human Biology**, v. 22, n. 2, p. 187–192, 2010.

LISTA, S. et al. **Biomarkers in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease** **Journal of Alzheimer's Disease**, 2015.

LYNCH, D. K. et al. A cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 24, p. 21805–21813, 2003.

MAO, Y. F. et al. Association of CD33 and MS4A cluster variants with Alzheimer's disease in East Asian populations. **Neuroscience Letters**, v. 609, p. 235–239, 2015.

MAURER, K.; VOLK, S.; GERBALDO, H. **Auguste D and Alzheimer's disease** **Lancet**, 1997.

MCKHANN, G. et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group\* under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. **Neurology**, v. 34, n. July 1984, p. 939–944, 1984.

MENDES, C. **Lítio e expressão gênica: implicações para a doença de Alzheimer**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2008.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MISZTAL, M.; FRANKIEWICZ, T. Learning deficits induced by chronic intraventricular infusion of quinolinic acid—protection by MK-801 and memantine. **European journal of pharmacology**, v. 296, n. 1, p. 1–8, 1996.

MIYASHITA, A. et al. SORL1 Is Genetically Associated with Late-Onset Alzheimer's Disease in Japanese, Koreans and Caucasians. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e58618, 2 abr. 2013.

MORGAN, K.; CARRASQUILLO, M. M. **Genetic variants in Alzheimer's disease**. New York, NY: Springer New York, 2013.

MORRISON, A. S.; LYKETSOS, C. R. Review the Pathophysiology of Alzheimer's Disease. **Advanced Studies in Nursing**, v. 3, n. 8, p. 256–270, 2005.

MOVSESYAN, N. et al. Reducing AD-like pathology in 3xTg-AD mouse model by DNA epitope vaccine - A novel immunotherapeutic strategy. **PLoS ONE**, v. 3, n. 5, 2008.

NAJ, A. C. et al. Common variants in MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33, and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. **Nature genetics**, v. 43, n. 5, p. 436–441, 2011a.

NAJ, A. C. et al. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. **Nature Genetics**, v. 43, n. 5, p. 436–441, 3 abr. 2011b.

NEFF, M. M.; TURK, E.; KALISHMAN, M. **Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis** *Trends in Genetics*, 2002.

NITRINI, R. et al. Prevalence of dementia in Latin America: a collaborative study of population-based cohorts. **International Psychogeriatrics**, v. 21, n. 4, p. 622, 2009.

NUSSBAUM, R. L.; ELLIS, C. E. Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 14, p. 1356–1364, 3 abr. 2003.

OLIVEIRA, J. R. M. et al. The genetics of Alzheimer's disease in Brazil: 10 Years of analysis in a unique population. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 37, n. 1, p. 74–79, 2009.

OMOUMI, A. et al. Evaluation of late-onset Alzheimer disease genetic susceptibility risks in a Canadian population. **Neurobiology of Aging**, v. 35, n. 4, p. 936.e5-936.e12, 2014.

ORGOGOZO, J.-M. et al. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after A 42 immunization. **Neurology**, v. 61, n. 1, p. 46–54, 2003.

PANTEV, M.; RITTER, R.; GORTELMEYER, R. **Clinical and behavioural evaluation in long-term care patients with mild to moderate dementia under Memantine treatment.** *Zeitschrift fur Gerontopsychologie und -psychiatrie*, 1993.

PAROLINI, D. et al. Expression of CD20 reveals a new store-operated calcium entry modulator in skeletal muscle. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, n. 12, p. 2095–2105, dez. 2012.

PARSONS, C. G. et al. Patch clamp studies on the kinetics and selectivity of N-methyl-d-aspartate receptor antagonism by memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantan). **Neuropharmacology**, v. 32, n. 12, p. 1337–1350, 1993.

PASCALE, M. et al. G Protein-coupled Receptor Kinase 2–mediated Phosphorylation of Ezrin Is Required for G Protein- coupled Receptor–dependent Reorganization of the Actin Cytoskeleton. **Molecular biology of the cell**, v. 16, n. 8, p. 1–13, 2005.

PASTERNAK, J. J. **Uma Introdução à Genética Molecular Humana: Mecanismos das Doenças Hereditárias.** 2ª ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2007.

PENA, S. D. J. et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

PIKE, K. E. et al.  $\beta$ -amyloid imaging and memory in non-demented individuals: Evidence for preclinical Alzheimer's disease. **Brain**, v. 130, n. 11, p. 2837–2844, 2007.

POIRIER, J. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. **Trends in neurosciences**, v. 17, n. 12, p. 525–530, 1994.

PRINCE, M. et al. **World Alzheimer Report 2016: Improving healthcare for people living with dementia.** London: Alzheimer's Disease International (ADI), 2016.

QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M. Alzheimer's Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 4, p. 329–344, 28 jan. 2010.

R DEVELOPMENT CORE TEAM, R. R: **A Language and Environment for Statistical Computing.** [s.l.: s.n.]. v. 1

REIBER, H.; PETER, J. B. **Cerebrospinal fluid analysis: Disease-related data patterns and evaluation programs** *Journal of the Neurological Sciences*, 2001.

RODRIGUES, C. L.; ZIEGELMANN, P. K. Metanálise: um guia prático. **Rev HCPA**, v. 30, n. 4, p. 436–447, 2010.

RODRIGUEZ, S.; GAUNT, T. R.; DAY, I. N. M. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. **American Journal of Epidemiology**, v. 169, n. 4, p. 505–514, 2009.

ROZEN, S.; SKALETISKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 132, p. 365–386, 2000.

SCHEFF, S. W.; SPARKS, D. L.; PRICE, D. A. Quantitative assessment of synaptic density in the entorhinal cortex in Alzheimer's disease. **Annals of Neurology**, v. 34, n. 3, p. 356–361, 1993.

SCHELLENBERG, G. D. et al. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. **Science**, v. 258, n. 5082, p. 668–671, 1992.

SCHENK, D. et al. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. **Nature**, v. 400, n. 6740, p. 173–7, 1999.

SCHWARZER, G.; MAIR, P.; HATZINGER, R. meta : An R Package for Meta-Analysis. **R News**, v. 7, p. 40–45, 2016.

SELKOE, D. J.; SCHENK, D. ALZHEIMER'S DISEASE : Molecular Understanding Predicts Amyloid-Based Therapeutics. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 545–584, abr. 2003.

SHULMAN, J. M. et al. Genetic susceptibility for Alzheimer disease neuritic plaque pathology. **JAMA neurology**, v. 70, n. 9, p. 1150–7, 2013.

SONG, F. et al. **Plasma biomarkers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease** *Brain Research Reviews*, 2009.

STOZICKA, Z.; ZILKA, N.; NOVAK, M. **Risk and protective factors for sporadic Alzheimer's disease**. *Acta Virologica*, 2007. Disponível em: <<http://www.elis.sk>>

STRITTMATTER, W. J. et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 5, p. 1977–1981, 1 mar. 1993.

SUH, Y.-H.; CHECLER, F. Amyloid Precursor Protein, Presenilins, and alpha -Synuclein: Molecular Pathogenesis and Pharmacological Applications in Alzheimer's Disease. **Pharmacological Reviews**, v. 54, n. 3, p. 469–525, 1 set. 2002.

SUZUKI, N. et al. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. **Science (New York, N.Y.)**, v. 264, n. 5163, p. 1336–40, 1994.

TAN, L. et al. Association of GWAS-linked loci with late-onset Alzheimer's disease in a northern Han Chinese population. **Alzheimer's and Dementia**, v. 9, n. 5, p. 546–553, 2013.



TAN, M.-S.; YU, J.-T.; TAN, L. Bridging integrator 1 (BIN1): form, function, and Alzheimer's disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 10, p. 594–603, out. 2013.

TAO, Q.-Q. et al. Decreased gene expression of CD2AP in Chinese patients with sporadic Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, p. 2–7, 2017.

TARIOT, P. N. et al. Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 291, n. 3, p. 317–324, 2004.

THOMAS, P.; FENECH, M. A review of genome mutation and Alzheimer's disease. **Mutagenesis**, v. 22, n. 1, p. 15–33, 2007.

TOKUDA, T. et al. Lipidation of apolipoprotein E influences its isoform-specific interaction with Alzheimer's amyloid  $\beta$  peptides. **Biochemical Journal**, v. 348, n. 2, p. 359–365, 2000.

UBELMANN, F. et al. Bin1 and CD2AP polarise the endocytic generation of beta-amyloid. **EMBO reports**, v. 18, n. 1, p. 102–122, 2017.

VANDENBERGHE, R. et al. Active A $\beta$  immunotherapy CAD106 in Alzheimer's disease: A phase 2b study. **Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions**, v. 3, n. 1, p. 10–22, 2017.

VILLEGAS-LLERENA, C. et al. Microglial genes regulating neuroinflammation in the progression of Alzheimer's disease. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 36, p. 74–81, fev. 2016.

WANG, H. Z. et al. Validating GWAS-Identified Risk Loci for Alzheimer's Disease in Han Chinese Populations. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 1, p. 379–390, 2014.

WENK, G. L. et al. No interaction of memantine with acetylcholinesterase inhibitors approved for clinical use. **Life Sciences**, v. 66, n. 12, p. 1079–1083, 2000.

WHEELER, D. L. et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information: update. **Nucleic acids research**, v. 32, n. Database issue, p. D35–40, 2004.

WOOD, J. G. et al. Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 11, p. 4040–3, 1986.

XIAO, Q. et al. Risk prediction for sporadic Alzheimer's disease using genetic risk score in the Han Chinese population. v. 6, n. 35, 2015.

YAARI, R.; COREY-BLOOM, J. Alzheimer's disease. **Seminars in neurology**, v. 27, n. 1, p. 32–41, 2007.

YU, J. T.; TAN, L.; HARDY, J. Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease: An Update. **Annual Review of Neuroscience**, v. 37, n. 1, p. 79–100, 2014.